

Fermentación de poda de olivo con microorganismos inmovilizados para la obtención de bioetanol

Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz

Grado en Biotecnología

Curso académico 2019-2020

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos

Autor: Germán López Toledo

Tutores: Manuel Jesús Díaz Villanueva

Gema Cabrera Revuelta

ÍNDICE

1. Propuesta del Trabajo Fin de Grado asignada.....	3
2. Resumen.....	4
3. Abstract.....	5
4. Introducción.....	6
4.1. La poda de olivo como materia prima.....	6
4.2. Pretratamiento.....	8
4.3. Hidrólisis.....	10
4.4. Fermentación.....	11
4.5. Inmovilización.....	12
4.6. El bioetanol como combustible.....	12
5. Objetivos.....	14
6. Solución Técnica.....	15
6.1. Composición y estructura de la materia prima.....	15
6.2. Pretratamientos para biomasa lignocelulósica: poda de olivo.....	20
6.3. Tipos de fermentación e integración de procesos.....	31
6.4. Clasificación de métodos de inmovilización.....	38
7. Conclusiones y perspectivas de futuro.....	43
8. Bibliografía.....	45

1. PROPUESTA DEL TRABAJO FIN DE GRADO ASIGNADA

Titulación: GBT

Título: Fermentación de poda de olivo con microorganismos inmovilizados para la obtención de bioetanol (nueva propuesta)

Curso: 2019/2020

Tutor1: manueljesus.diaz@uca.es (INGENIERÍA QUÍMICA Y TECN. DE ALIMENTOS)

Tutor2: gema.cabrera@uca.es (INGENIERÍA QUÍMICA Y TECN. DE ALIMENTOS)

Carácter: Bibliográfico

Descripción:

La poda del olivo es una operación imprescindible para el acondicionamiento de los árboles a la climatología y para elevar su productividad. Desde hace años, se está trabajando en gestionar de forma adecuada los residuos generados en la poda del olivar, a través de diferentes tecnologías, en función del origen y naturaleza de cada uno de ellos, obteniendo así una valorización energética óptima. Estos residuos presentan una composición estructural lignocelulósica, la cual está formada por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Dada la naturaleza lignocelulósica que presenta, resulta prometedor el estudio de su aprovechamiento bioquímico para la posterior obtención de bioetanol. El proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos del olivar (bioetanol de 2ª generación) presenta un esquema similar al que se sigue en las biomasas de naturaleza amilácea o azucarada (bioetanol de 1ª generación), si bien hay que destacar la mayor complejidad estructural presente en la poda. Las principales etapas del proceso de producción de bioetanol a partir de poda de olivo son: pretratamiento, hidrólisis y fermentación, pudiéndose realizar por distintas vías y con diferentes microorganismos fermentadores. Actualmente la mayoría de los procesos químicos llevados a cabo por células requieren su reutilización debido a razones técnicas y económicas. Por este motivo, la inmovilización es una técnica que permite reutilizar o emplear de forma continuada microorganismos fermentativos.

El presente TFG se va a centrar en la etapa de fermentación a partir de poda de olivo pretratada en condiciones óptimas para la obtención de bioetanol. La etapa de fermentación se llevará a cabo con microorganismos capaces de fermentar los azúcares presentes en la poda y utilizando técnicas de inmovilización.

Alumno propuesto: german.lopeztoledo@alum.uca.es

Curso: 2019/2020

Fecha: 02/04/2020 18:10:14

Es propuesta de alumno: SÍ; 1 Aceptada profesor: SÍ; Aceptada depto.: SÍ; Aceptada comisión: SÍ.

2. RESUMEN

La poda de olivo como biomasa puede resultar una buena materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación. Al tratarse de una biomasa lignocelulósica, y tomando como referencia la ruta biotecnológica seguida para su aprovechamiento, requiere de una etapa de pretratamiento que haga más accesible la celulosa, una hidrólisis de ésta para liberar azúcares y, por último, una fermentación para convertir los azúcares en bioetanol. En el presente documento, además del estudio de este proceso de obtención de bioetanol a partir de poda de olivo, se ha abordado la posibilidad de inmovilizar las células fermentativas para protegerlas de las condiciones desfavorables de la hidrólisis en una hipotética hidrólisis y fermentación simultáneas. Con el objetivo de estudiar las diversas posibilidades para pretratar la poda de olivo, las diferentes estrategias de fermentación y las distintas técnicas de inmovilización, se llevó a cabo una revisión bibliográfica del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación centrando la atención en la poda de olivo, biomasa abundante en la Comunidad Autónoma de Andalucía. En función a la bibliografía consultada, el esquema de trabajo más prometedor estaría compuesto por un pretratamiento secuencial de molienda, extracción con agua líquida caliente y explosión de vapor (en conjunto presenta buenos rendimientos de bioetanol), una hidrólisis enzimática y una fermentación simultánea a la hidrólisis con inmovilización de las células fermentativas (suele obtener mejores rendimientos de bioetanol que la hidrólisis y fermentación por separado). Para completar el estudio y ampliar el campo de conocimiento, se necesita de más experiencias a diversos niveles de escalado y con varias de las opciones de pretratamiento, fermentación e inmovilización.

Palabras clave: bioetanol, poda de olivo, lignocelulosa, pretratamiento, fermentación, inmovilización.

3. ABSTRACT

Olive tree pruning as biomass can be a good raw material for second generation bioethanol production. As it is a lignocellulosic biomass, and taking as a reference the biotechnological route followed for its use, it requires a pretreatment stage to make the cellulose more accessible, a hydrolysis of the cellulose to release sugars and, finally, a fermentation to convert the sugars into bioethanol. In addition to the study of this process of obtaining bioethanol from olive tree pruning, this paper has addressed the possibility of immobilizing the fermentation cells to protect them from the unfavorable conditions of hydrolysis in a hypothetical simultaneous hydrolysis and fermentation. In order to study the various possibilities for pretreating olive tree pruning, the different fermentation strategies and the various immobilization techniques, a review was carried out on the process of obtaining second generation bioethanol focusing on olive tree pruning, a biomass that is abundant in the Autonomous Community of Andalusia. According to the literature consulted, the most promising working scheme would be composed of a sequential pretreatment of grinding, extraction with hot liquid water and steam explosion (together it presents good bioethanol yields), enzymatic hydrolysis and simultaneous fermentation with immobilization of the fermentation cells (usually obtaining better bioethanol yields than hydrolysis and fermentation separately). To complete the study and broaden the field of knowledge, more experiences are needed at various levels of scaling and with several of the pretreatment, fermentation and immobilization options.

Keywords: bioethanol, olive tree pruning, lignocellulose, pretreatment, fermentation, immobilization.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. La poda de olivo como materia prima

La Comunidad Autónoma de Andalucía, junto con Extremadura, el sur de Castilla-La Mancha y el Levante español, tradicionalmente han sido regiones propicias para el cultivo del olivar (Figura 4.1). En el caso concreto de Andalucía, principal superficie olivarera de España, en 2019 se dedicaron aproximadamente 1.578.130 hectáreas para dicho propósito, según la Secretaría General de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Junta de Andalucía.

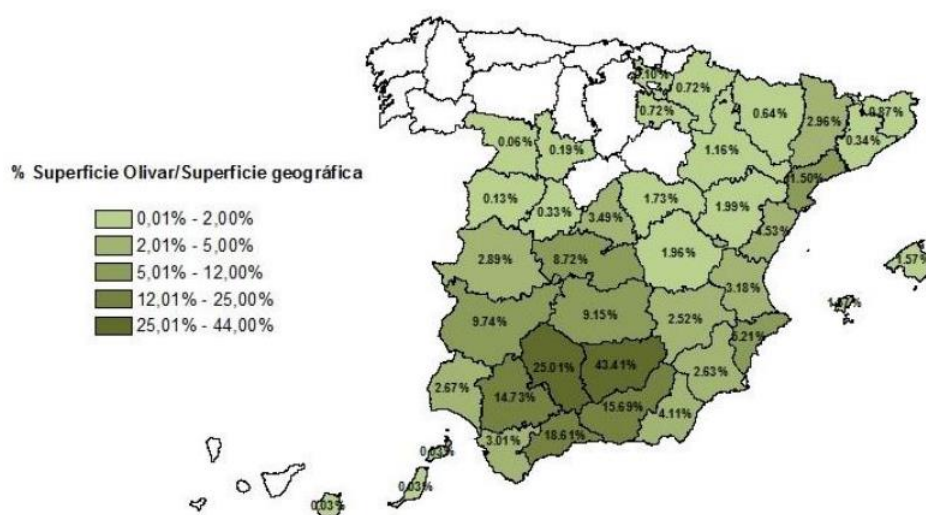


Figura 4.1. Superficie de olivar respecto a la superficie geográfica provincial (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2012).

Como resultado del cultivo intensivo del olivar en Andalucía, y de la consecuente industria relacionada (almazaras y extractoras principalmente), se genera una gran cantidad de residuos (Tabla 4.1). Según la Agencia Andaluza de la Energía (AAE), en 2017 se estimó que por cada hectárea de olivar se generan 3 toneladas de poda, y por cada tonelada de aceituna se obtienen 0,083 toneladas de hueso, 0,197 toneladas de orujillo y 0,438 toneladas de agua.

Tabla 4.1. Tipos de residuos y subproductos generados en el olivar y en la elaboración del aceite de oliva (Díaz, 2011).

Industriales	
-	Almazaras
o	Orujos de tres fases
o	Orujos de dos fases (95% de los orujos generados)
o	Hojas
o	Huesos
-	Extractoras
o	Orujillo
o	Huesos de aceitunas
o	Efluentes gaseosos, líquidos y sólidos

Derivados del cultivo de olivo	
-	Poda del olivo
o	Biomasa lignocelulósica (leña, ramón y hojas)

La utilización de algunos de estos residuos agrícolas como materia prima de una hipotética biorrefinería, desde la perspectiva meramente energética, podría reportar 803 kilotoneladas equivalentes de petróleo por año (AAE, 2017). De esta forma, se contribuiría a la progresiva disminución del uso de las fuentes de energía no renovables y se fomentaría el autoabastecimiento del territorio, que en 2018 presentaba una tasa de dependencia energética del 83% según la Agencia Andaluza de la Energía.

El presente trabajo se centra en la utilización de la poda de olivo como materia prima para la obtención de bioetanol combustible. Actualmente, sólo se aprovecha el 20% para generación eléctrica, el resto es quemado en los campos de cultivo sin darle ningún uso (AAE, 2017), liberando dióxido de carbono a la atmósfera. La posibilidad que se propone para su aprovechamiento sería el empleo de la conversión bioquímica de dicha biomasa lignocelulósica (constituida mayoritariamente por leña, ramón y hoja (Figura 4.2)) para obtener bioetanol de segunda generación. Otra utilidad podría ser emplearla como cubierta vegetal tras el triturado.

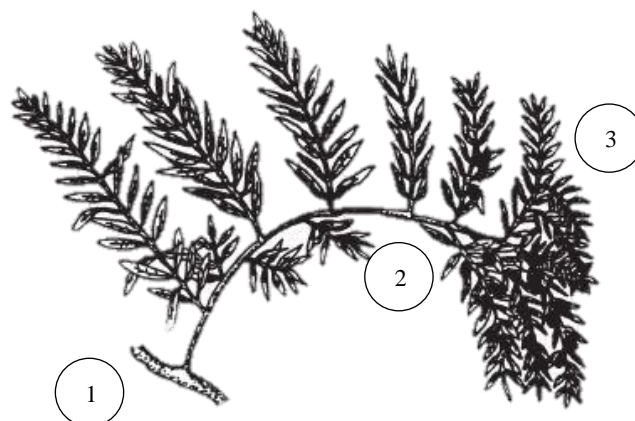


Figura 4.2. Constitución típica de la poda de olivo. 1: Leña. 2: Ramón. 3: Hojas. Dibujo de Ceccolini y Bruni (1979).

Como aclaración, el bioetanol de segunda generación es aquel obtenido a partir de biomasa lignocelulósica. Por otro lado, entrando en detalle sobre la biomasa lignocelulósica, decir que está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos.

La celulosa y hemicelulosa son carbohidratos, por lo que pueden ser convertidos en combustible mediante fermentación, previa despolimerización. La gran abundancia de esta biomasa, su bajo coste y el alto contenido en carbohidratos hacen atractiva a la biomasa lignocelulósica como materia prima (Kim, 2013). Para facilitar la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa, se llevarán a cabo distintos procesos (Figura 4.3).

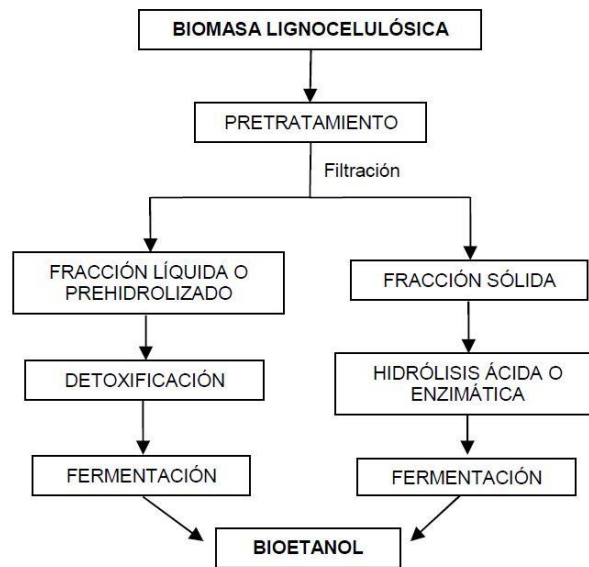


Figura 4.3. Esquema general de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (Díaz, 2011).

4.2. Pretratamiento

Con esta etapa, que resulta imprescindible en la producción de bioetanol de segunda generación, se persigue hacer accesible la celulosa a la acción posterior de las enzimas hidrolíticas.

Los factores que afectan a la posterior hidrólisis se clasifican en barreras químicas y físicas (Kim, 2013):

- **Barreras químicas**

- Lignina: Una pronta retirada de la lignina eliminaría su interacción con la celulosa, por lo que aumentaría la eficiencia de la hidrólisis. La lignina y sus derivados son tóxicos para los microorganismos e inhiben la posterior despolimerización.
- Hemicelulosa: Sus uniones con la lignina forma una compleja red que no sólo proporciona fuerza estructural, sino que también desafía la degradación microbiana. Se cree que al eliminar la hemicelulosa aumenta el tamaño de poros de la biomasa y la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Sin embargo, esto no siempre es cierto.
- Grupos acetilo: No está claro si la desacetilación aumenta la digestibilidad o la causa la retirada de hemicelulosa (con alto contenido en grupos acetilo).

- **Barreras físicas**

- Cristalinidad: La cristalinidad de la celulosa, fruto de los fuertes puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, es resistente a reacciones químicas.

- Área superficial: El concepto de superficie accesible está muy relacionado con la cristalinidad. A más superficie disponible para la celulasa, mayor será la tasa de hidrólisis enzimática.
- Grado de polimerización: El grado de polimerización de la celulosa residual tras el pretratamiento puede influir en la hidrólisis. Normalmente, el pretratamiento logra reducirlo.

Entrando en detalle en las posibles dificultades que pueden surgir a partir del pretratamiento, es importante resaltar la formación de inhibidores de la fermentación (Tabla 4.2). Éstos presentarán efectos tóxicos en los organismos fermentativos, provocando una reducción del rendimiento de bioetanol y su productividad. La toxicidad de los compuestos inhibitorios será mayor cuando se presentan juntos, debido a un efecto sinérgico (Harmsen *et al.*, 2010).

Tabla 4.2. Inhibidores de la fermentación (Harmsen *et al.*, 2010).

Productos de degradación de azúcares¹
<ul style="list-style-type: none"> - Derivados de pentosas <ul style="list-style-type: none"> ○ Furfural: Afecta al crecimiento celular y a la respiración. - Derivados de hexosas <ul style="list-style-type: none"> ○ Hidroximetil-furfural (HMF): Afecta al crecimiento celular y a la respiración.
Productos de degradación de lignina
<ul style="list-style-type: none"> - Compuestos fenólicos: Causan partición y pérdida de integridad de las membranas celulares, reduciendo el crecimiento celular y la asimilación de azúcares.
Productos derivados de hemicelulosa
<ul style="list-style-type: none"> - Ácido acético: Disminuye el pH intracelular, inhibiendo la actividad celular.
Extractivos inhibidores
<ul style="list-style-type: none"> - Resinas ácidas - Ácidos taninos - Ácidos terpénicos
Iones de metales pesados
<ul style="list-style-type: none"> - Hierro: Inhibe enzimas metabólicas. - Cromo: Inhibe enzimas metabólicas. - Níquel: Inhibe enzimas metabólicas. - Cobre: Inhibe enzimas metabólicas.

¹ La degradación de la celulosa y hemicelulosa es la responsable de la formación de estos compuestos. A más temperatura y tiempo de reacción, mayor formación.

El resultado del pretratamiento variará en función del método escogido, pudiendo hacerse secuencialmente incluso dos o más métodos distintos. En el caso de la poda de olivo, muchos artículos emplean varios pretratamientos de manera sucesiva (Ballesteros *et al.*, 2011; Martínez-Patiño *et al.*, 2017a; Negro *et al.*, 2014).

Se lleve a cabo un pretratamiento u otro, se tratará de que cumpla con las siguientes características recomendadas (Kim, 2013):

- Lograr una alta tasa de hidrólisis enzimática y un alto rendimiento de productos de fermentación.
- Causar la mínima degradación de la fracción de carbohidratos.
- No producir compuestos tóxicos que inhiban a los microorganismos.
- Bajos costes en materia prima.
- Operar en condiciones poco severas para reducir costes.
- Poder reutilizar el reactivo o utilizar un químico barato.
- Usar menos entrada de líquido para reducir coste energético.
- Generar pocos residuos.
- Simplificar el proceso.

A estas recomendaciones se podría añadir el intentar usar reactivos poco nocivos.

4.3. Hidrólisis

Tras el filtrado que sigue al pretratamiento, se obtiene una fracción líquida y otra sólida. El presente trabajo se centrará en el proceso que sufre la masa sólida para llegar a obtener bioetanol. Dicha fracción sólida insoluble, constituida mayoritariamente por lignina y celulosa, será sometida a una hidrólisis con el objetivo de obtener los monómeros que conforman la celulosa, ahora más accesible gracias a la etapa previa. Respecto a la fracción líquida, tal y como se observa en la Figura 4.3, podría fermentarse tras una detoxificación.

La hidrólisis puede llevarse a cabo mediante catalizadores ácidos o enzimáticos. Las principales desventajas de la hidrólisis ácida es el alto coste de la recuperación de ácidos y el elevado precio del equipamiento, que debe soportar la corrosión generada (Díaz, 2011). Además, se contravendrían algunas de las recomendaciones expuestas en el apartado anterior, como emplear condiciones poco severas o minimizar la formación de inhibidores.

En cuanto a la hidrólisis enzimática, permite establecer condiciones leves de operación, alta conversión de celulosa en azúcares y no se forman inhibidores de la fermentación. Se produce la acción sinérgica de al menos tres enzimas celulasas: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas. Las dos primeras actúan sobre la celulosa produciendo celobiosa. Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa y otras celodextrinas, reduciendo el efecto inhibitorio sobre las endoglucanasas y exoglucanasas. De esta forma, las β -glucosidasas controlan la velocidad global de la reacción (Escobar *et al.*, 2015).

La hidrólisis enzimática y la fermentación pueden llevarse a cabo de manera simultánea o por separado. Cada opción presenta sus ventajas y desventajas, aunque se ahondará en ellas más adelante.

4.4. Fermentación

Como resultado de los procesos anteriores se dispondrá de azúcares libres, tanto hexosas como pentosas. En la poda de olivo, la hexosa más representativa será la glucosa, y la pentosa más abundante la xilosa.

En esta etapa, un microorganismo se dedicará a transformar los azúcares libres en bioetanol, dióxido de carbono y energía. Teniendo en cuenta que el máximo rendimiento teórico estequiométrico (51,1%) nunca se alcanza, se utilizarán aquellos microorganismos que más se aproximen. No se alcanza la máxima conversión posible porque parte de la glucosa se usa para producir material celular y otros productos metabólicos distintos al bioetanol (Naik *et al.*, 2010).

Cuando el sustrato es la glucosa, la reacción de la fermentación alcohólica es la siguiente:



Normalmente, los microorganismos aprovechan mayoritariamente las hexosas a la hora de llevar a cabo su transformación en bioetanol y, aunque existen estudios con poda de olivo que empleen bacterias recombinantes como la *Escherichia coli* MM160, eficientes en soluciones de hexosa-pentosa (Martínez-Patiño *et al.*, 2017b), gran parte de las investigaciones se centran en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, incapaz de fermentar las pentosas (Ballesteros *et al.*, 2011; Cara *et al.*, 2008a; Manzanares *et al.*, 2011).

La *Saccharomyces cerevisiae* se usa con tanta frecuencia por ser un microorganismo ampliamente estudiado, capaz de alcanzar un rendimiento cercano al máximo teórico y de resistir altas concentraciones de bioetanol. Sin embargo, para aumentar la competitividad económica del proceso, es necesario aprovechar todo el rango de azúcares disponibles (Kumar *et al.*, 2009), por lo que a largo plazo se habrá de invertir tiempo y recursos en obtener microorganismos modificados genéticamente capaces de producir bioetanol tanto de hexosas como de pentosas.

Algunos microorganismos que de forma natural emplean pentosas, siendo capaces de llevar a cabo su conversión a bioetanol, son la *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* (Díaz, 2011). A pesar de ello, muestran desventajas de operación que dificultan su implantación: sensibilidad a alta concentración de bioetanol, a temperatura, baja tolerancia frente a inhibidores e incapacidad de fermentar xilosa a bajo pH.

Según Mohagheghi *et al.* (2002), la cepa de *Zymomonas mobilis* AX101, obtenida mediante modificación genética, es capaz de llevar a cabo la cofermentación de hexosas y pentosas. No obstante, el presente trabajo se centrará en el aprovechamiento de las hexosas, por lo que el microorganismo al que se le dará más importancia es la *Saccharomyces cerevisiae*.

4.5. Inmovilización

Sería interesante para el proceso poder implementar la hidrólisis y fermentación simultáneas ya que, de esta forma, se suele lograr una mayor producción de bioetanol que cuando se realizan por separado. La mayor limitación será que la temperatura óptima de las celulasas es superior a la apropiada para la actividad fermentativa de los microorganismos (Toor *et al.*, 2020). Dada esta limitación, en el trabajo se expone la opción de emplear una inmovilización que proteja a los microorganismos de las condiciones desfavorables de la fase de hidrólisis.

Existen diversos métodos de inmovilización, tanto físicos como químicos, de los que se hablarán más adelante, pero en este caso la atención se centrará en la microencapsulación mediante geles de alginato cálcico debido a la falta de estudios en procesos que impliquen a la poda de olivo como materia prima para producir bioetanol y a la simplicidad del método. Dicha inmovilización es un método físico que utiliza el alginato, un polímero orgánico (Romero *et al.*, 2000). Sin embargo, el método de las perlas de alginato presenta ventajas e inconvenientes (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Ventajas y desventajas del método de perlas de alginato cálcico (Romero *et al.*, 2000; Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008).

Ventajas
<ul style="list-style-type: none">- Seguro (soporte no tóxico)- Fácil y rápida aplicación- Versátil- Bajo coste- Mayor actividad metabólica: Podría estar relacionada la disminución del pH en el interior de las perlas.- Resistencia a la toxicidad
Desventajas
<ul style="list-style-type: none">- Baja estabilidad: Los geles son muy sensibles a agentes quelantes y a altas concentraciones de iones que no inducen la gelificación.- Alta porosidad: Supone un difícil control de problemas de lixiviación, aunque puede ser una ventaja al permitir elevadas velocidades de difusión de sustratos y productos.- Biocompatibilidad: Algunos polímeros de alginato contienen polifenoles, que pueden dañar a células sensibles.- Concentración de biomasa: La concentración no disminuye, pero tampoco puede aumentar al estar las células atrapadas; de esta forma las células no se renuevan.

4.6. El bioetanol como combustible

Los biocombustibles son aquellas fuentes de energía obtenidas mediante diversos métodos de conversión a partir de biomasa. No son la solución definitiva a los problemas energéticos, económicos y ambientales, pero son una fuente alternativa, complementaria a las tradicionales en el corto y medio plazo (Ramos *et al.*, 2016).

Respecto al bioetanol, biocombustible que incumbe al presente trabajo, se caracteriza por su elevado contenido energético. Tiene un comportamiento similar al de la gasolina, lo que junto a su poder antidetonante hace posible su utilización en alimentación de motores de ciclo Otto. Además, muestra mayor capacidad antioxidante y superior volatilidad (AAE, 2011).

El bioetanol suele clasificarse en función a su pertenencia a una u otra generación. Aquellos casos correspondientes a la primera, emplean materias primas ricas en sacarosa y almidón. El bioetanol de segunda generación proviene de biomasa lignocelulósica, caso en que se centra el documento (Tabla 4.4). La tercera generación, menos comentada habitualmente, se trata del bioetanol obtenido a partir de las algas (Azhar *et al.*, 2017). En cuanto a la cuarta generación, el bioetanol se produce a partir de organismos genéticamente modificados para que capturen más dióxido de carbono del ambiente (Ramos *et al.*, 2016).

Tabla 4.4. Ventajas y desventajas del bioetanol de segunda generación (elaboración propia).

Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> - No compite con industria alimentaria - Aprovecha residuos agrícolas y forestales - Posibilidad de generar coproductos de alto valor añadido - Gran disponibilidad de la biomasa - Bajo coste de materia prima
Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Requiere de varias etapas para acceder a azúcares libres - Se generan inhibidores de fermentación - Aún existe bajo grado de integración en la mayoría de plantas de producción - Tecnología en fase incipiente para algunas etapas - Dificultad en cofermentación de hexosas y pentosas

Actualmente, el bioetanol más empleado es el de primera generación, siendo Estados Unidos y Brasil los productores principales (Taherzadeh y Karimi, 2008). Sin embargo, los cultivos usados para la producción de bioetanol de primera generación, como el maíz y la caña de azúcar, generan competencia con el mercado de la alimentación (Slade *et al.*, 2011). Es por ello que gana relevancia la opción de producir biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica.

Lo ideal sería la existencia de amplios terrenos de cultivo energético que no tensionaran el precio de los alimentos. En el ámbito autonómico, según el Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, en el año 2009 sólo se emplearon 840,02 hectáreas para cultivos de producción de energías renovables.

5. OBJETIVOS

En el presente escrito se hace una revisión bibliográfica sobre las distintas etapas que constituyen actualmente el proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, centrándose en el caso específico del uso de la poda de olivo como materia prima. Los objetivos concretos del trabajo son los siguientes:

1. Recopilar varios métodos de pretratamiento de la poda de olivo para la obtención de bioetanol.
2. Analizar las diferentes estrategias de fermentación en los procesos de producción de bioetanol.
3. Exponer las posibles técnicas de inmovilización de microorganismos a emplear en la etapa fermentativa.
4. Realizar algunas propuestas innovadoras respecto a las investigaciones encontradas en la literatura.

6. SOLUCIÓN TÉCNICA

6.1. Composición y estructura de la materia prima

Composición de la poda de olivo

A la hora de llevar a cabo las etapas necesarias para obtener bioetanol a partir de la poda de olivo, será conveniente conocer la composición molecular de ésta para determinar qué repercusión, adversa o no, puede tener cada posible método sobre el conjunto del proceso.

Observando algunas tablas de caracterización de la poda de diversos artículos (Cara *et al.*, 2007; López-Linares *et al.*, 2013; Martínez-Patiño *et al.*, 2017b), se llega a la conclusión de que los compuestos predominantes, y su rango de proporciones más característico, son los mostrados a continuación (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Composición de la poda de olivo antes del pretratamiento (Cara *et al.*, 2007; López-Linares *et al.*, 2013; Martínez-Patiño *et al.*, 2017b).

Compuestos (% base seca) ¹
Glucosa procedente de celulosa (23,8-35,8)
Azúcares hemicelulósicos
- Xilosa (10,5-14,3)
- Galactosa (1,3-2,7)
- Arabinosa (2,2-3,3)
- Manosa (0,6-2,2)
Lignina
- Lignina insoluble en ácido (15,8-18)
- Lignina soluble en ácido (1,5-2,5)
Extractivos (22,2-33)
- Glucosa (5,6-8,6)
Grupos acetilo (1,9-2,6)
Cenizas (2,5-3,5)

¹ Los datos aquí reflejados no han tenido en cuenta el porcentaje de humedad, es decir, son sobre materia seca.

Respecto a factores que pueden hacer oscilar la proporción de cada compuesto, se encuentra, por ejemplo, el contenido en hojas frente a otras partes de la poda, de modo que a mayor cantidad de hojas mayor cantidad de extractivos y cenizas habrá. Por tanto, al resultar más interesante un bajo porcentaje de estos componentes y uno mayor en celulosa (para tener más cantidad de sustrato que convertir a bioetanol), sería más favorable emplear fracciones de poda con mayor contenido en ramas. Esto podría lograrse llevando a cabo una separación de las distintas fracciones durante la recogida de la poda en el campo. Otros factores influyentes son el terreno, que si carece de los nutrientes suficientes impide el correcto desempeño de la función clorofílica de las hojas (transformación de sustancias inorgánicas de suelo y atmósfera en compuestos utilizables para el crecimiento y desarrollo de la planta), o la edad (tienden a engrosar su madera con los años) (Molina de la Rosa *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se escogió la poda de olivo como materia prima para la obtención de bioetanol, entre otras razones, por la gran disponibilidad existente en la Comunidad Autónoma de Andalucía; aun así, resulta interesante comparar la proporción de celulosa que ofrece la poda de olivo con respecto a otros posibles residuos lignocelulósicos (Tabla 6.2):

Tabla 6.2. Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa en los residuos lignocelulósicos.

Biomasa	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Referencia
Paja de trigo	12,4	38,7	30,0	(Ramos, 2017)
Vaina de arveja	15,1	44,9	28,4	(Ramos, 2017)
Bagazo de maíz	10,1	28,3	25,0	(Ramos, 2017)
Paja de cebada (O'Connor)	7,3	23,8	33,7	(Summerell y Burgess, 1989)
Paja de colza	17,1	36,6	24,1	(Díaz <i>et al.</i> , 2010)
Bagazo de caña de azúcar	17,8	38,6	27,9	(Guilherme <i>et al.</i> , 2015)
Poda de olivo	17,3-20,5	23,8-35,8	14,6-22,5	Tabla 6.1

Se observa que la paja de trigo, la vaina de arveja, la paja de colza y el bagazo de caña contienen un porcentaje de celulosa superior al rango mostrado en la Tabla 6.1 por la poda de olivo. Sin embargo, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en Andalucía sólo se destinaron 252.300 hectáreas al cultivo de cereales (2019a), 40.171 hectáreas al cultivo de leguminosas grano (2020), 8.267 hectáreas al cultivo de colza y 39 hectáreas al de caña de azúcar (2019b). Todo ello frente a 1.578.130 hectáreas dedicadas al olivar. Dado que los residuos lignocelulósicos del cultivo olivarero son mayores en cantidad, en la Comunidad Autónoma de Andalucía resulta más provechosa la utilización de poda de olivo como materia prima.

Con objeto de comprender la composición molecular de la poda de olivo, se procede a analizar cada uno de los componentes más relevantes:

- **Glucosa**

Monosacárido de seis carbonos que contiene un grupo aldehído en el extremo (Figura 6.1), es decir, es una aldohexosa. Aunque también puede encontrarse como extractivo, el caso mayoritario es que provenga de la celulosa.

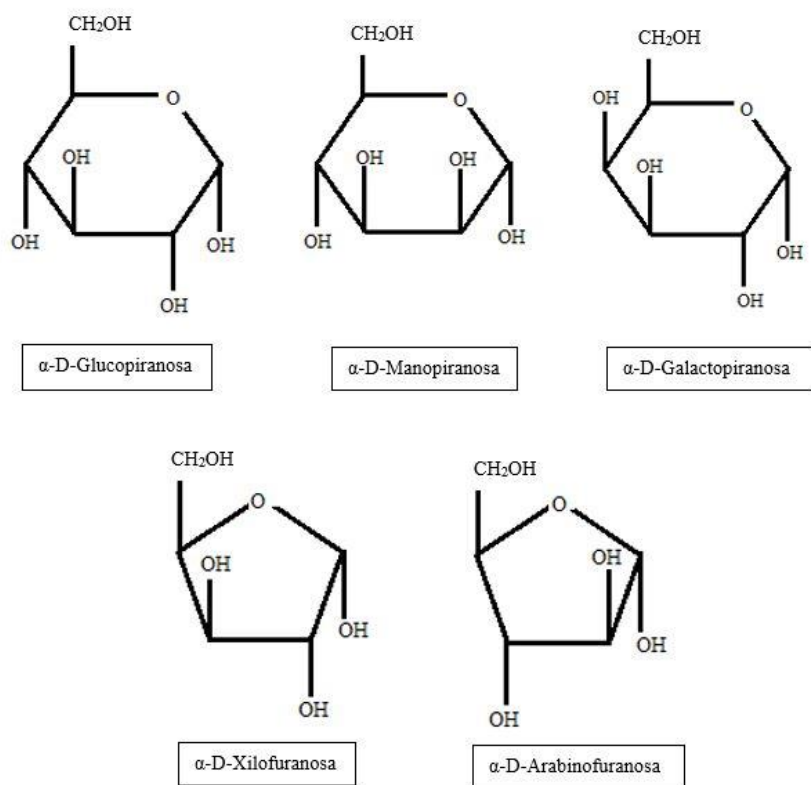


Figura 6.1. Estructura molecular de los distintos monosacáridos mencionados (elaboración propia).

La celulosa es un homopolisacárido lineal en que las unidades de glucosa están vinculadas entre sí a través de enlaces glicosídicos β -1,4 (Figura 6.2). Las moléculas de celulosa se agregan en paquetes formando microfibras donde las regiones cristalinas se alternan con las regiones amorfas (menos ordenadas). Las microfibrillas se acumulan en fibrillas y fibras de celulosa. Estas estructuras tienen una fuerte tendencia a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Kim, 2013).

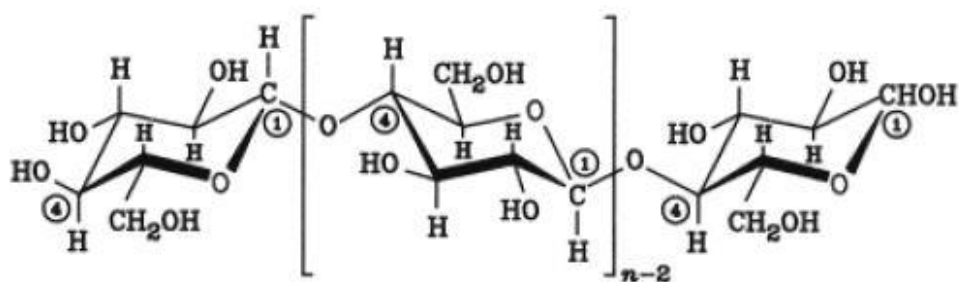


Figura 6.2. Estructura molecular de la celulosa (Harmsen *et al.*, 2010).

El papel de la celulosa en el proceso será el de proporcionar glucosa tras la hidrólisis. La molécula de glucosa es el principal sustrato usado por los microorganismos durante la etapa de fermentación.

- **Xilosa**

Es un monosacárido de cinco carbonos que presenta un grupo funcional aldehído (Figura 6.1), siendo por tanto una aldopentosa. Se localiza en la hemicelulosa, heteropolisacárido complejo y ramificado (carente de estructura cristalina), formando el polisacárido xilano.

La molécula de xilano, componente mayoritario en la hemicelulosa, está constituida por una cadena principal de monómeros de D-xilosa unidos mediante enlaces β -1,4. Debido a su naturaleza compleja y heterogénea, para su degradación completa se requiere de la acción cooperada y coordinada de una gran cantidad de enzimas hidrolíticas (Sainz, 2016). Sin embargo, dado que la producción de bioetanol se centra en la degradación de la celulosa, no se añadirán las enzimas necesarias para degradar el xilano, sino que la degradación se producirá de forma circunstancial.

Toda vez que habrá xilano en el medio, será conveniente intentar aprovecharlo en beneficio del proceso para, como se dijo en la introducción, aumentar la competitividad económica.

- **Galactosa**

La galactosa es otro monosacárido de seis carbonos (Figura 6.1), una aldohexosa. Por tanto, aunque se encuentre de manera minoritaria en la biomasa, podrá ser fermentado con facilidad por los microorganismos.

- **Arabinosa**

Al igual que la xilosa, es una aldopentosa (Figura 6.1). Estará presente en menor proporción y ofrece algunas dificultades para su conversión a bioetanol, como una mayor lentitud en la reacción. Incluso algunos microorganismos capacitados para degradar xilosa, como la *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada, tienen incapacidad para metabolizar la arabinosa.

- **Manosa**

Es un monosacárido de seis carbonos con un grupo funcional aldehído (Figura 6.1), es decir, una aldohexosa. Como la glucosa y la galactosa, será fácilmente fermentable.

- **Lignina**

La lignina no es un compuesto definido constitutivamente, sino que es un material física y químicamente heterogéneo consistente en unidades de fenilpropano conjugadas de manera variada en el proceso de biosíntesis (Figura 6.3), formando un polímero tridimensional carente de estructura macromolecular ordenada y regular. Varias combinaciones estructurales de las cadenas laterales y p-hidroxifenil, guaiacil y siringil aumentan la diversidad en la estructura de la lignina. Podría decirse incluso que la diversidad de las combinaciones estructurales es ilimitada (Hatakeyama y Hatakeyama, 2009).

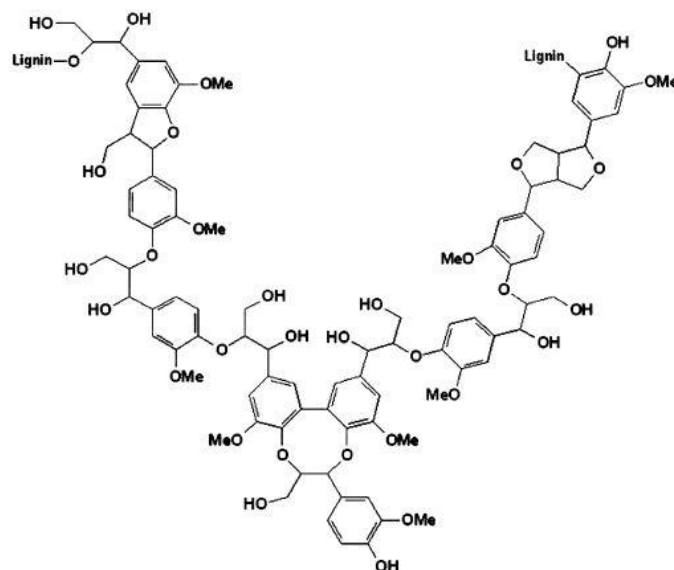


Figura 6.3. Estructura molecular de una pequeña parte del polímero de lignina (Kim, 2013).

Como se dijo en la introducción, la lignina es una barrera química que dificulta el acceso a la celulosa. Ésta presenta tres tipos diferentes de enlaces con los carbohidratos: enlaces éter, éster y glicosídico (Kim, 2013). Por ello, uno de los objetivos principales del pretratamiento es disolver la lignina, aunque sólo una pequeña parte de ella muestra predisposición para disolverse en presencia de ácido.

- **Extractivos**

Son aquellos componentes, hidrofílicos o lipofílicos, solubles en agua o disolventes orgánicos neutros (Kim, 2013). Entre los extractivos se encuentran gran variedad de compuestos, tales como aceites y grasas vegetales (minoritario en la poda, ya que suele encontrarse en las semillas), almidón (del que puede obtenerse más glucosa), pectinas (heteropolisacárido que forma parte de la pared celular), azúcares libres y proteínas.

Como se profundizará más adelante, en una etapa inicial del proceso de valorización de la poda, suelen extraerse mediante agua líquida caliente para que no interfieran a la hora de acceder a la celulosa.

- **Grupos acetilo**

Son grupos funcionales que forman un enlace éster con los hidroxilos de la cadena principal del polímero de hemicelulosa, y que se liberan mediante la hidrólisis de éste.

Al igual que la lignina, son una barrera química que afecta al pretratamiento. Además, suelen derivar en ácido acético, compuesto que disminuye el pH del medio durante la fermentación, inhibiendo así la actividad celular.

- **Cenizas**

Las cenizas, compuestos inorgánicos de la biomasa que permanecen después de su incineración, están constituidas mayoritariamente por calcio, potasio y magnesio (Fengel y Weneger, 1989).

Suele interesar que su contenido sea bajo, ya que generan problemas para su reciclaje y pueden causar escorificación e incrustaciones en los equipos.

Estructura molecular de la poda de olivo

La estructura lignocelulósica (Figura 6.4) propiamente dicha, está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual resulta en un agregado complejo en que la lignina actúa como continente de los dos polisacáridos mencionados.

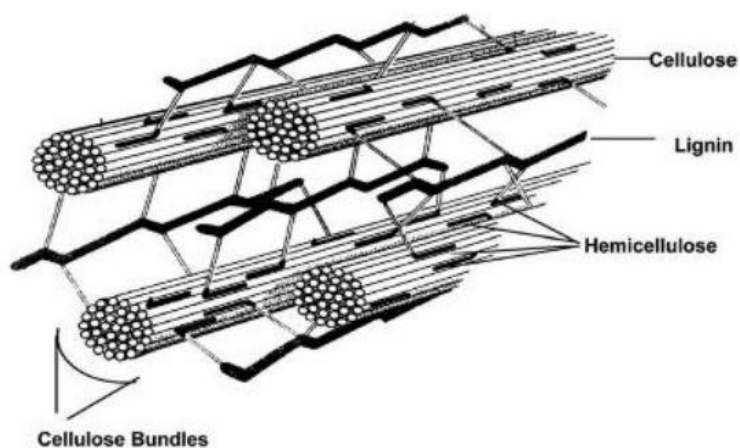


Figura 6.4. Representación de la estructura de la biomasa lignocelulósica (Kamm *et al.*, 2006).

La celulosa, con zonas de estructura amorfa y cristalina, se dispone en largas cadenas rectas. Dicha disposición, unida al hecho de que habrá hidróxidos distribuidos uniformemente a ambos lados de los monómeros de glucosa, permite la formación de puentes de hidrógeno entre los polímeros de celulosa. Como consecuencia, se da lugar a un compuesto de varias cadenas paralelas unidas entre sí (Harmsen *et al.*, 2010).

Respecto a la hemicelulosa, de estructura únicamente amorfa, se sitúa entre las micro y macrofibras de celulosa. Por su parte, la lignina se enlaza de diferentes formas con los carbohidratos, actuando como estructura de la matriz en que se incrustan la celulosa y la hemicelulosa (Harmsen *et al.*, 2010).

6.2. Pretratamientos para biomasa lignocelulósica: poda de olivo

La etapa de pretratamiento, como ya se indicó en la introducción, es crucial para el correcto desempeño del resto del proceso y la satisfactoria obtención del bioetanol de segunda generación. Sin embargo, a pesar de una adecuada aplicación del pretratamiento, dependiendo del método escogido se

lograrán mejores o peores resultados. Es por ello que, a continuación, se describirán las principales técnicas.

Tratamientos físicos

Gran parte de la biomasa lignocelulósica necesita de un tratamiento mecánico previo para reducir el tamaño, mejorando así los resultados de la hidrólisis posterior al favorecer la transferencia de materia (Morales, 2015). La fragmentación de la biomasa puede lograrse de diversas formas, como la irradiación y la extrusión, aunque destaca especialmente la molienda.

La técnica de la molienda reduce la cristalinidad y el grado de polimerización de la biomasa, aumenta el área superficial y no produce inhibidores. Como consecuencia, se llega a incrementar el rendimiento de hidrólisis de un 5 a un 25%. El tiempo de digestión técnica se reduce en un 23-59% (Hendriks y Zeeman, 2009).

Como ya se ha indicado en el primer párrafo, es común aplicar algún tratamiento mecánico previo. Esto no es distinto en la producción de bioetanol a partir de poda de olivo, donde suele realizarse una molienda para reducir el tamaño de la biomasa (Manzanares *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2011; López-Linares *et al.*, 2013).

Sus principales desventajas son el elevado coste y la gran cantidad de energía requerida.

Tratamientos termoquímicos

En algunas clasificaciones también son llamados tratamientos fisicoquímicos.

- **Agua líquida caliente**

El objetivo de este método es solubilizar la hemicelulosa para hacer la celulosa más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para ello, es recomendable que el pH se mantenga entre 4 y 7 con la finalidad de minimizar la formación de monosacáridos y productos de degradación (Hendriks y Zeeman, 2009).

Resulta interesante que en varios artículos en que se emplea la poda de olivo como materia prima para el proceso, se llevan a cabo dos o más etapas de pretratamiento, siendo el agua líquida caliente uno de los más usados tras la molienda (Cara *et al.*, 2007; Manzanares *et al.*, 2011; Martínez-Patiño *et al.*, 2017a; Negro *et al.*, 2014). El motivo principal por el que se hace un pretratamiento de agua líquida caliente es, como indica Ballesteros *et al.* (2011), que se pretende extraer de la biomasa tantos extractivos como sea posible. Como consecuencia de la reducción de extractivos en la composición de la poda de olivo, aumenta la proporción de glucosa, xilosa y lignina, mientras que el porcentaje de ceniza y algunos azúcares hemicelulósicos disminuye levemente.

A la hora de utilizar este método a nivel de laboratorio, resulta recomendable el uso del autoclave, ya que es un instrumento frecuente y no supondría un gasto adicional. Sin embargo, conlleva una serie de limitaciones en cuanto a la temperatura y el tiempo que se pueden programar.

- **Explosión de vapor**

La explosión de vapor combina el método hidrotermal con un cambio brusco de presión durante el tratamiento de la biomasa. En un primer momento, la materia prima se somete a elevada temperatura y presión con vapor de agua, pero de forma repentina se produce una descompresión que provoca la explosión de las fibras de la biomasa por el vapor (Aditiya *et al.*, 2016).

La temperatura idónea suele encontrarse entre los 160 y 260 °C, mientras que la presión entre 0,69 y 4,83 MPa. Se logra la degradación de la hemicelulosa y la transformación de la lignina y, reseñablemente, es la técnica más utilizada para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos y una de las más rentables (Morales, 2015). En el caso concreto de la poda de olivo como materia prima para la obtención de bioetanol, la explosión de vapor también es bastante común, bien sea de aplicación única o tras el agua líquida caliente (Ballesteros *et al.*, 2011; Negro *et al.*, 2014).

Una diferencia entre este método y el agua líquida caliente (Tabla 6.3) es que la cantidad de productos solubilizados con agua líquida caliente es mayor, aunque la concentración de dichos productos sea menor. Además, la explosión de vapor supone el riesgo de generar inhibidores de la fermentación alcohólica como el furfural, compuestos fenólicos o hidroximetilfurfural (Hendriks y Zeeman, 2009).

Tabla 6.3. Comparación entre el método de agua caliente líquida y explosión de vapor en biomasa de bagazo de caña de azúcar (Laser *et al.*, 2002).

Efecto	Agua caliente líquida	Explosión de vapor
Recuperación de biomasa	Promedio de 90%	Promedio de 90%
Disolución de biomasa	17-50%	4-35%
Conversión en hidrólisis y fermentación simultáneas	Superior al 90%	Superior al 90%
Recuperación de xilano	83% (220 °C y 2 minutos)	48% (220 °C y 2 minutos)
Solubilización de xilano	34% (200 °C y 2 minutos)	15% (200 °C y 2 minutos)
Recuperación de glucano	Promedio de 97%	Promedio de 97%
Solubilización de glucano	Promedio de 6%	Promedio de 4%
Inhibición de fermentación	No produce inhibidores (≤ 215 °C y 2 minutos)	Produce inhibidores

Según Cara *et al.* (2008a) la explosión de vapor es un método muy eficiente que da lugar a 7,2 gramos de bioetanol por cada 100 gramos de materia prima (bioetanol tras 72 horas de hidrólisis y fermentación simultáneas; habrá impregnación de la biomasa con agua a 240 °C).

- **Explosión de fibras con amoníaco (AFEX)**

El proceso de explosión con amoníaco es similar al de explosión con vapor (Sun y Cheng, 2002), con la diferencia de que la biomasa es mezclada con una disolución de amoníaco.

Con el método AFEX se consigue disminuir la densidad aparente, ampliar el área accesible, reducir la cristalización, degradar hemicelulosa y causar roturas en la lignina (Aditiya *et al.*, 2016). Como punto negativo, no ha demostrado ser demasiado efectivo en maderas duras y blandas (McMillan, 1994).

A pesar de que no se han encontrado estudios que traten la poda de olivo con explosión de fibras con amoníaco, existen investigaciones con otras biomásas lignocelulósicas, tales como el pasto varilla (*Panicum virgatum*). En el artículo de Alizadeh *et al.* (2005) se indica que el rendimiento de producción de bioetanol alcanzado tras la optimización es de 0,2 gramos de bioetanol por cada gramo de biomasa seca.

- **Explosión con CO₂**

Al igual que el método AFEX, se asemeja a la explosión de vapor. Según McMillan (1994), existen estudios en que se utiliza la explosión con CO₂ en alfalfa, donde se demostró que el método AFEX obtenía mejores rendimientos a menores presiones, por lo que se abandonó la investigación con CO₂.

- **Pirólisis**

La pirólisis supone la degradación térmica de la biomasa lignocelulósica mediante una secuencia de reacciones complejas en un ambiente libre de oxígeno, creado principalmente por un barrido de gas nitrógeno. La estructura de la biomasa acabará descomponiéndose en productos de menor peso molecular como el bioaceite, los gases y el carbón vegetal (Kabir y Hameed, 2017). Según las condiciones de operación, se obtendrá mayor o menor proporción de cada producto.

Para degradar la hemicelulosa se emplearán temperaturas de entre 250 y 400 °C, para la celulosa entre 310 y 430 °C y para la lignina el rango suele ser de 300-530 °C (Morales, 2015). En presencia de una atmósfera inerte, la despolimerización se produce más lentamente que en la despolimerización pirolítica de oxígeno; también se retrasa la formación de subproductos no deseados (Fan *et al.*, 1982).

Tratamientos químicos

A pesar de que las técnicas químicas de pretratamiento son consideradas la opción más adecuada para la producción de biocombustibles a escala comercial, y sus ventajosas propiedades (tales como la disponibilidad, su bajo coste o el verse menos afectadas por el desarrollo tecnológico que las enzimas)

(Aditiya *et al.*, 2016), estos métodos chocan frontalmente con la intención de emplear reactivos poco nocivos y evitar la inhibición en etapas posteriores.

- **Ozonólisis**

El ozono degrada principalmente a la lignina, mientras que la hemicelulosa sólo se ve afectada ligeramente y la celulosa queda intacta. El proceso se lleva a cabo a temperatura y presión ambiente. Como principal desventaja, requiere gran cantidad de ozono, por lo que el proceso es de coste elevado (Morales, 2015).

En el estudio de Travaini *et al.* (2013) con bagazo de caña de azúcar en que se empleó un pretratamiento de ozonólisis, se confirma que apenas se ataca a los carbohidratos, logrando una recuperación de celulosa y xilano de más del 92%. Además, no se encontraron los compuestos inhibitorios furfural ni hidroximetilfurfural, solamente se detectaron xilitol, ácido láctico, fórmico y acético.

- **Ácidos**

Dentro del tratamiento con ácido se podría diferenciar entre la utilización de ácido diluido y concentrado, pero dado que el ácido concentrado provocaría la hidrólisis de la celulosa y en el presente apartado se aborda la etapa de pretratamiento con vistas a realizar una hidrólisis enzimática posterior, las atenciones se centrarán en el ácido diluido.

Los ácidos diluidos que suelen emplearse para pretratar la poda de olivo son: ácido sulfúrico (Cara *et al.*, 2008b; Manzanares *et al.*, 2011; Martínez-Patiño *et al.*, 2017b) y ácido fosfórico (Martínez-Patiño *et al.*, 2015), aunque mayoritariamente el ácido sulfúrico. El proceso se lleva a cabo a elevadas temperaturas (130-240 °C) durante largos períodos de tiempo y supone una hidrólisis casi completa de la hemicelulosa y parcial de la celulosa. El método es de bajo coste, aunque se genera gran cantidad de inhibidores: una porción importante de xilosa es convertida a furfural y la glucosa se degrada a hidroximetilfurfural (Kim, 2013).

En el caso concreto del artículo de Cara *et al.* (2008b), donde se trabaja con ácido sulfúrico diluido, se alcanza el máximo rendimiento de la hidrólisis enzimática a 210 °C y 1,4% (w/w) de concentración de ácido. Para encontrar el óptimo se operó en el rango de temperatura 170-210 °C y con las concentraciones 0,2, 0,6, 1,0 y 1,4%. Sin embargo, las condiciones adecuadas varían en función a si se quiere mayor recuperación de azúcares hemicelulósicos (170 °C y 1,0% concentración de ácido) o mayor rendimiento en la obtención de azúcares fermentables (180 °C y 1,0% concentración de ácido).

A pesar de la aparición de inhibidores y el uso de un reactivo nocivo, el tratamiento con ácido diluido podría resultar muy interesante en una hipotética biorrefinería de tercera generación, es decir, de integración completa. Una forma de llevarlo a cabo sería acoplar al proceso una etapa de producción

de ácido biológico, para la que se podrían utilizar bacterias azufre oxidantes como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, que son capaces de oxidar azufre elemental u otros compuestos de azufre reducido para generar ácido sulfúrico, dando lugar a un medio líquido extremadamente ácido (Cabrera *et al.*, 2008). Con vistas a la producción de bioetanol a partir de poda de olivo, dicho ácido sulfúrico de origen bacteriano resultaría de utilidad en el pretratamiento de la biomasa. La biorrefinería bien podría acoplarse a un reactor biológico puesto en marcha con este fin o formar parte de un proceso de biolixiviación de metales pesados ya implementado. Sería interesante profundizar en esta posibilidad mediante experiencias que comenzaran a escala de laboratorio.

- **Álcalis**

El pretratamiento con álcalis causa la solubilización de la hemicelulosa y parte de la lignina, mejorando la degradabilidad de la celulosa. Sin embargo, la propia solubilización de estos componentes genera inhibidores de la fermentación (Hendriks y Zeeman, 2009).

Según algunos estudios con pretratamiento de álcalis sobre biomasa lignocelulósica, como el de Wu *et al.* (2011), la mejora en la digestibilidad se debe a la ruptura de la matriz lignina-carbohidratos. En dicho artículo concreto, en que se trabaja con bagazo de sorgo dulce como materia prima, aumenta la digestibilidad enzimática alcanzando un rendimiento de hidrólisis del 98%.

La eficacia del pretratamiento con uno de los álcalis más utilizados, el hidróxido de sodio, es mayor en paja que en madera dura, debido principalmente al menor contenido en lignina de la paja (McMillan, 1994).

Comparando este método con el tratamiento ácido (Tabla 6.4), los álcalis no requieren temperaturas tan altas, aunque sí tiempos más prolongados de reacción (Morales, 2015).

Tabla 6.4. Comparación entre el tratamiento con álcalis y ácidos diluidos en biomasa de tallos de algodón (Silverstein *et al.*, 2007).

Efecto	Álcali	Ácido diluido
Sólidos recuperados	Disminuyen (elevada temperatura, tiempo de residencia y concentración)	Disminuyen (elevada temperatura, tiempo de residencia y concentración)
Recuperación de xilano	7,91-13,0%	0,0-10,24%
Solubilización de xilano	13,9-40,02%	95,2% (condiciones más severas)
Recuperación de glucano	35,54-50,33%	33,74-46,3%
Solubilización de glucano	12,82-30,14%	10,0-23,88%
Reducción de lignina	65,63% (máximo)	2,27-24,16%

- **Organosolventes**

Se emplea una mezcla de disolvente orgánico-acuoso u orgánico con catalizadores ácidos. Los disolventes más utilizados suelen ser el metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurilo. Mediante este método se rompe la lignina interna y los enlaces de la hemicelulosa (Morales, 2015).

Presenta buena efectividad en la producción de bioetanol de alta calidad, pero resulta poco recomendable a escala industrial por el elevado coste de los solventes (Aditiya *et al.*, 2016).

Según Díaz *et al.* (2011), que estudia el pretratamiento con organosolventes usando la poda de olivo como biomasa, cuanto más severas sean las condiciones del pretratamiento y mayor contenido de etanol en el disolvente, mayor deslignificación habrá. También determina que el pretratamiento con organosolventes es uno de los más efectivos para la posterior hidrólisis enzimática (89,6% de rendimiento de hidrólisis bajo las condiciones de pretratamiento de 210 °C durante 15 minutos y con el 43% (w/w) de etanol en el organosolvente).

Tratamientos biológicos

El pretratamiento basado en la actuación de microorganismos consiste en la capacidad de éstos para degradar de manera selectiva la lignina. Algunos de los organismos más prometedores pertenecen al grupo de hongos de raíz blanca, tales como *Irpex lacteus*, que producen enzimas extracelulares hidrolíticas y enzimas oxidativas. Según Sindhu *et al.* (2016), tras 28 días de pretratamiento sobre biomasa lignocelulósica, se reportó un 82% de rendimiento en la hidrólisis posterior al tratamiento biológico con *Irpex lacteus*. También se estudió cómo afectaba el cambio de alimentación en la efectividad del método con hongos: los resultados demuestran que *Ceriporiopsis subvermispora*, el hongo de raíz blanca con el que se llevó a cabo la investigación, fue efectivo en la deslignificación de maíz, pasto y madera.

Algunas de las ventajas del tratamiento biológico son el bajo coste, la poca dependencia energética y, como se indicó en los requisitos de la introducción, evitar el uso de reactivos nocivos para con el medio ambiente.

Como aspectos negativos, son procesos lentos, necesitan de un control riguroso del crecimiento microbiano y muchos microorganismos lignocelulósicos consumen parte de la celulosa y hemicelulosa (Morales, 2015).

Otros

- **Fluido supercrítico**

Consiste en la extracción de lignina, resina y material ceroso de la lignocelulosa (McMillan, 1994) mediante compuestos a los que se les somete a condiciones de temperatura y presión por encima de su punto crítico, adquiriendo así características propias de gases y líquidos. Es común la utilización de dióxido de carbono al ser barato y no tóxico.

Mediante la utilización del fluido supercrítico, se generan productos de baja inhibición, la lignina se retira eficientemente en condiciones suaves y se perfora la estructura cristalina con facilidad sin degradar monómeros de azúcar (Aditiya *et al.*, 2016). Se necesitan equipos de alta presión, lo que incrementa su coste.

Al igual que con otros muchos pretratamientos enumerados en este apartado, sería conveniente experimentar con la aplicación del fluido supercrítico sobre la poda de olivo. Sin embargo, sí ha sido probado en otras biomásas lignocelulósicas; por ejemplo, en el artículo de Gu *et al.* (2013), se comparan las condiciones de temperatura, presión y tiempo empleadas con el dióxido de carbono supercrítico según la biomasa que se usa como materia prima (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Biomasa lignocelulósica tratada con dióxido de carbono supercrítico en la literatura (Gu *et al.*, 2013).

Biomasa	Presión (psi)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Paja de arroz	1450-4350	40-110	15-45
Guayule	2500-4000	100-200	30-60
Bagazo	1100-4000	25-80	60
Pasto varilla	2900	160	60
Rastrojo de maíz	2900	160	60
Mezcla de madera dura	2900	160-210	60
Pino amarillo del sur	4000	112-165	10-60
Álamo	3100	112-165	10-60

- **Líquidos iónicos**

Son sales con un punto de fusión por debajo de 100 °C, formadas normalmente por un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico (Figura 6.5). Aquellos que presentan aniones con capacidad para aceptar hidrógeno en sus bandas de valencia y no son hidrófobos, además de no contener sustituyentes muy voluminosos, serán buenos disolventes de celulosa (Morales, 2015).

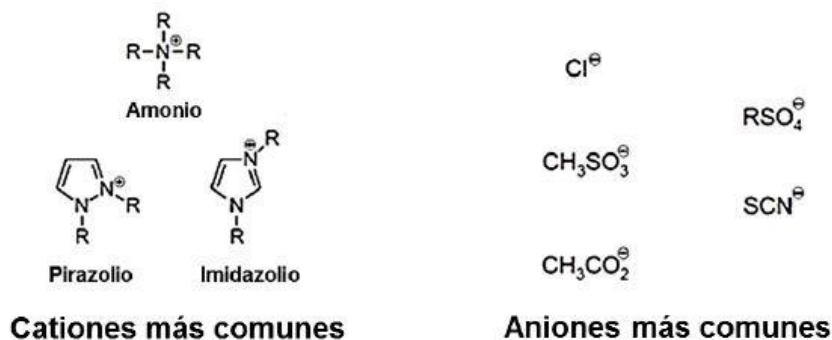


Figura 6.5. Algunos de los cationes y aniones más comunes en líquidos iónicos (Morales, 2016).

Los líquidos iónicos son recalcitrantes en el medio ambiente, tóxicos para los seres vivos y su coste es elevado para el uso a gran escala (Gu *et al.*, 2013).

De acuerdo con Elgharbawy *et al.* (2016), existen estudios en que los líquidos iónicos lograron mejorar la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar con un rendimiento de obtención de glucosa del 99,7% (120 °C y 60 minutos como condiciones de pretratamientos).

Comparativa de pretratamientos en poda de olivo

Con el objetivo de fijar la vista en aquellos pretratamientos más utilizados cuando la materia prima es la poda de olivo, se presenta a continuación una tabla recopilatoria con parte de la literatura existente sobre la producción de bioetanol a partir de poda de olivo (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Comparativa de distinta literatura que emplea poda de olivo.

Pretratamiento	Hidrólisis	Fermentación	Óptimo	Referencia
1. Extracción con agua líquida caliente (121 °C y 60 minutos) 2. Explosión de vapor (diferentes temperaturas y tiempo)	Enzimas celulolíticas y enzimas con actividad β-glucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> en batch con hidrólisis y fermentación separadas	<u>Explosión de vapor:</u> 204 °C y 29 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 24,4 g glucosa/100 g biomasa)	(Ballesteros <i>et al.</i> , 2011)
1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (diferentes temperaturas y tiempo)	Enzimas celulolíticas y β-glucosidasa fúngica	-	<u>Extracción con agua líquida caliente:</u> 200 °C y 60 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 17,8 g glucosa/100 g biomasa; 75 g glucosa/100 g glucosa en material pretratado)	(Cara <i>et al.</i> , 2007)

1. Molienda 2. Explosión de vapor (diferentes temperaturas; parte de biomasa se impregna con agua o ácido sulfúrico diluido)	Enzimas celulolíticas y β -glucosidasa fúngica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> en batch con hidrólisis y fermentación simultáneas	<u>Explosión de vapor:</u> Impregnación con H ₂ SO ₄ 2% (w/w) a 230 °C durante 5 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 11,6 g glucosa/100 g biomasa; 69,9 g glucosa/100 g glucosa en material pretratado)	(Cara <i>et al.</i> , 2008a)
1. Molienda 2. Ácido sulfúrico diluido (diferentes temperaturas y concentraciones)	Enzimas celulolíticas y β -glucosidasa fúngica	-	<u>Ácido sulfúrico diluido:</u> Concentración 1,4% (w/w) a 210 °C durante 10 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 13,8 g glucosa/100 g biomasa; 76,5 g glucosa/100 g glucosa en fracción sólida insoluble)	(Cara <i>et al.</i> , 2008b)
1. Molienda 2. Organosolvente etanol-agua (diferentes concentraciones, temperaturas y tiempo)	Enzimas celulolíticas y β -glucosidasa fúngica	-	<u>Organsolvólisis:</u> 210 °C, 15 minutos y 43% (w/w) etanol (máximo obtenido en hidrólisis: 89,6% (glucosa liberada respecto el contenido total de glucano en la biomasa, incluyendo extractivos))	(Díaz <i>et al.</i> , 2011)
1. Molienda 2. Solución de FeCl ₃ (diferentes temperaturas, concentraciones y tiempo)	Enzimas celulolíticas y β -glucosidasa fúngica	-	<u>Solución de FeCl₃:</u> 160 °C, 30 minutos y 0,275 M (máximo obtenido en hidrólisis: 38,9 g glucosa/100 g glucosa de la biomasa)	(López-Linares <i>et al.</i> , 2013)
1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (210 °C y 10 minutos) 3. Ácido sulfúrico diluido (180 °C, 10 minutos y 1% (w/w) de concentración)	Enzimas celulolíticas y β -glucosidasa fúngica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> en batch, comparando la hidrólisis y fermentación separadas, simultáneas y una prehidólisis con hidrólisis y fermentación simultáneas	<u>Fermentación:</u> Según la concentración inicial de la fracción insoluble en agua, será mejor un proceso fermentativo u otro	(Manzanares <i>et al.</i> , 2011)

1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (120 °C y 60 minutos) 3. Ácido sulfúrico diluido (diferentes concentraciones y tiempo) 4. Peróxido de hidrógeno en medio alcalino (diferentes concentraciones y tiempo)	Enzimas celulolíticas y enzimas con actividad β -glucosidasa	<i>Escherichia coli</i> MM160 en batch para fermentación de prehidrolizado y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en batch para hidrólisis y fermentación simultáneas de poda de olivo deslignificada	<u>Peróxido de hidrógeno en medio alcalino:</u> 5,83% (w/v) de H ₂ O ₂ y 60 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 93,3% (gramos de glucosa liberada sobre 100 gramos de glucosa en la biomasa deslignificada))	(Martínez-Patiño <i>et al.</i> , 2017a)
1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (120 °C y 60 minutos) 3. Ácido sulfúrico diluido (diferentes concentraciones y temperaturas)	Enzimas celulolíticas y enzimas con actividad β -glucosidasa	<i>Escherichia coli</i> MM160 en batch para fermentación de prehidrolizado	<u>Ácido sulfúrico diluido:</u> 200 °C durante 10 minutos y 0,08 g H ₂ SO ₄ /g biomasa (máximo obtenido en hidrólisis: 97,7% (gramos de glucosa liberada sobre 100 gramos de glucosa en la biomasa pretratada))	(Martínez-Patiño <i>et al.</i> , 2017b)
1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (120 °C y 60 minutos) 3. Ácido fosfórico diluido (diferentes concentraciones y temperaturas)	Enzimas celulolíticas y enzimas con actividad β -glucosidasa	<i>Escherichia coli</i> MSO4 en batch para fermentación de prehidrolizado y fermentación del hidrolizado enzimático	<u>Ácido fosfórico diluido:</u> 210 °C durante 10 minutos y 1,5% (w/v) de concentración de H ₃ PO ₄ (máximo obtenido en hidrólisis: 85,8% (glucosa liberada respecto al contenido de glucosa en la fracción sólida insoluble))	(Martínez-Patiño <i>et al.</i> , 2015)
1. Molienda 2. Extracción con agua líquida caliente (121 °C y 60 minutos) 3. Explosión de vapor (diferentes temperaturas; materia prima se impregna con ácido fosfórico 1% (w/w))	Enzimas celulolíticas y enzimas con actividad β -glucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> en batch para hidrólisis y fermentación simultáneas y fermentación de prehidrolizado	<u>Explosión de vapor:</u> 195 °C durante 10 minutos (máximo obtenido en hidrólisis: 68 g glucosa/L)	(Negro <i>et al.</i> , 2014)

En todos los casos se observa la combinación de dos o más pretratamientos de la poda de olivo, destacando la molienda, que aumenta la eficacia del pretratamiento y el rendimiento de la hidrólisis

posterior, y la extracción con agua líquida caliente que, como se explicó anteriormente, extrae tantos extractivos como sea posible. A pesar de la variedad de pretratamientos mostrados en la Tabla 6.6, resultaría recomendable experimentar con algunos de los muchos métodos mencionados en el presente apartado, como la ozonólisis, los tratamientos biológicos, los fluidos supercríticos o los líquidos iónicos.

Sobre los rendimientos de hidrólisis en los artículos en que se empleó explosión de vapor, resulta llamativo cómo Cara *et al.* (2008a) obtiene un rendimiento de hidrólisis de sólo el 11,6 g glucosa/100 g biomasa mientras que Ballesteros *et al.* (2011), sin necesidad de realizar una impregnación con ácido sulfúrico, logra mejores resultados. Esto podría deberse a que Cara *et al.* (2008a) no utiliza una extracción con agua líquida caliente previa que retire algo de lignina y compuestos solubles en agua (extractivos). Lo mismo sucede en el caso del pretratamiento de ácido sulfúrico diluido: el rendimiento de hidrólisis en Martínez-Patiño *et al.* (2017a), que incorpora una extracción con agua líquida caliente y otro paso con peróxido de hidrógeno en medio alcalino, es superior al rendimiento obtenido por Cara *et al.* (2008b), que sólo emplea la molienda y el propio ácido sulfúrico como pretratamientos. El mayor rendimiento de hidrólisis lo alcanza Martínez-Patiño *et al.* (2017b), utilizando extracción con agua líquida caliente y ácido sulfúrico diluido, además de la molienda.

Sobre la temperatura y tiempo de los pretratamientos, en la extracción con agua líquida caliente es común que se rondan los 120 °C y los 60 minutos, lo que resulta muy conveniente para la operación a escala de laboratorio, como ya se dijo anteriormente. Sin embargo, en pretratamientos como el de la explosión con vapor, cuyo óptimo puede superar los 200 °C, obliga a utilizar un equipamiento especial que soporte las condiciones de operación (altas presiones), consiguiendo mayores rendimientos con tiempos de operación que son menores. En cuanto al rango de tiempo óptimo para el pretratamiento de poda de olivo con explosión de vapor, se encuentra entre 5 y 29 minutos, siendo el tiempo menor cuando la biomasa se impregna con algún ácido.

6.3. Tipos de fermentación e integración de procesos

Tipos de fermentación

A la hora de diseñar el proceso mediante el cual se producirá bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, no sólo hay que decidir cómo se integrarán los pasos, sino también qué tipo de fermentación se llevará a cabo. A continuación, se expondrán las principales opciones a escoger.

- **Fermentación en batch**

La fermentación en batch, o discontinuo, suele ser una de las más empleadas, tanto a nivel de laboratorio como en el industrial. En ella, los parámetros cinéticos para la producción de bioetanol dependerán de la cantidad inicial de células y la concentración de azúcares (Laopaiboon *et al.*, 2007).

Los microorganismos trabajan en presencia de altas concentraciones de sustrato al principio y a altas concentraciones de producto al final. El proceso es fácil de controlar, pero se obtienen bajos rendimientos de producción de bioetanol (Toor *et al.*, 2020).

- **Fermentación en fed-batch**

En el método fed-batch se suministra de manera progresiva una alimentación al reactor con el sustrato de fermentación (Figura 6.6), evitando así un exceso al principio que ocasione la inhibición de los microorganismos. De esta forma mejora el rendimiento de producción de bioetanol respecto a la fermentación en batch.

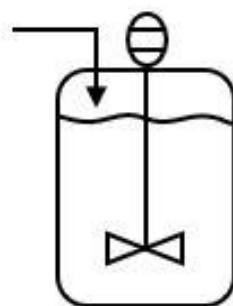


Figura 6.6. Biorreactor fed-batch (elaboración propia).

- **Fermentación en continuo**

La fermentación en continuo, que puede realizarse en un solo reactor o en varios en serie, pretende mejorar el rendimiento de producción de bioetanol. En el caso de aplicar el método en el formato de múltiples reactores en serie, se constituye un sistema en que el agente fermentador se introduce exclusivamente en la primera etapa junto con el sustrato estéril, que entra progresivamente. El flujo al siguiente biorreactor se hará mediante una tubería de conexión a través de la cual se produce el desbordamiento desde cada recipiente lleno hasta el siguiente en la secuencia (Alzola, 1945).

Es un proceso fácil de controlar, pero cuando ocurren contaminaciones es necesario detenerlo, limpiar todo el equipo y comenzar de nuevo. Por otro lado, se reduce el tiempo de limpieza, recarga, ajuste del medio y esterilización (Toor *et al.*, 2020).

- **Fermentación en estado sólido**

Este método, según Pandey (2003), es definido como una fermentación de sólidos en ausencia total, o casi total, de agua; sin embargo, el sustrato ha de poseer la humedad suficiente como para sustentar el crecimiento y metabolismo del microorganismo responsable.

En los últimos años ha aumentado la credibilidad de la fermentación en estado sólido debido a la gran cantidad de aplicaciones que aporta, además de ofrecer la posibilidad de aprovechar residuos

agroindustriales en el proceso. Un mejor conocimiento de los aspectos de la bioquímica ingenieril, especialmente en el modelado matemático y diseño de biorreactores, ha hecho posible el escalado de este método, llegando incluso a comercializarse algunos modelos de forma económicamente viable (Singhania *et al.*, 2009).

Una de las principales ventajas de la fermentación en estado sólido es el pequeño tamaño de las partículas, lo que facilita la exposición del área superficial y mejora la accesibilidad de los nutrientes a los microorganismos. Por otra parte, la materia se compacta, dificultando la aireación, la disipación de calor y limitando el crecimiento microbiano. Además, aunque las condiciones permiten el crecimiento de levaduras, el microorganismo mejor adaptado será el hongo filamentoso (gracias a sus hifas, que penetran fácilmente por los canales intraparticulares) (Toor *et al.*, 2020). El presente trabajo se centra en la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Integración de procesos

Como se ha ido indicando a lo largo del texto, el proceso de producción de bioetanol de segunda generación implica varias etapas, entre las que se encuentran el pretratamiento, la producción de las enzimas hidrolíticas, la hidrólisis de la celulosa, la fermentación de azúcares de seis carbonos, la fermentación de azúcares de cinco carbonos y, por último, la destilación.

Tradicionalmente, cada paso ha sido ejecutado de manera secuencial, pero gracias a la investigación científica, existen diversos estudios que alteran el proceso en busca de los mejores rendimientos. En el presente apartado se expondrán las distintas combinaciones existentes entre las etapas, salvo el pretratamiento y la destilación, que han de llevarse a cabo al inicio y al final de la producción respectivamente.

- **Hidrólisis y fermentación separadas**

El método de hidrólisis y fermentación separadas (Figura 6.7) sería el convencional, es decir, con cada etapa realizada de manera secuencial. Al llevarse a cabo la producción de bioetanol de esta forma, se consume mucho tiempo y resulta de coste elevado. Además, la actividad de las celulasas se ve inhibida durante la hidrólisis por la liberación de azúcares. La principal ventaja del proceso sería que tanto la hidrólisis como la fermentación podrían operar en sus condiciones específicas de reacción (Toor *et al.*, 2020).

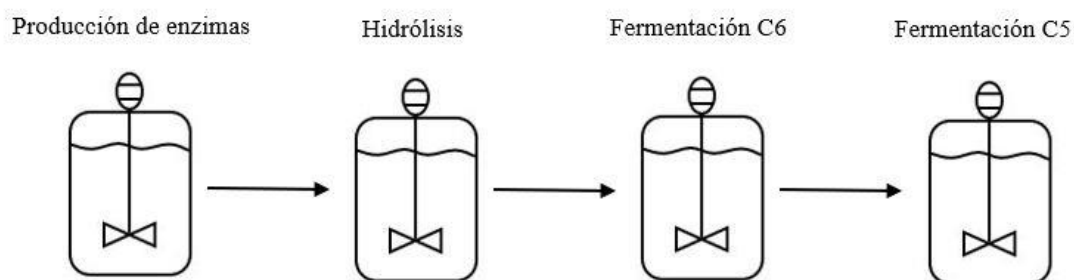


Figura 6.7. Proceso de hidrólisis y fermentación separadas (elaboración propia).

Como queda ilustrado en la Figura 6.7, no sólo la hidrólisis y la fermentación se dan separadas, sino que la producción de enzimas, que suelen obtenerse de cepas del hongo *Trichoderma*, y la fermentación, que se divide en dos subetapas, también se llevan a cabo en pasos diferenciados. En el caso de las fermentaciones, para cada una de ellas se necesitarán microorganismos distintos.

- **Hidrólisis y fermentación simultáneas**

El proceso consiste en la descomposición de la celulosa y la fermentación de los azúcares producidos en un mismo reactor. Sin embargo, tanto la producción de enzimas como la fermentación de pentosas continúan realizándose a parte (Figura 6.8).

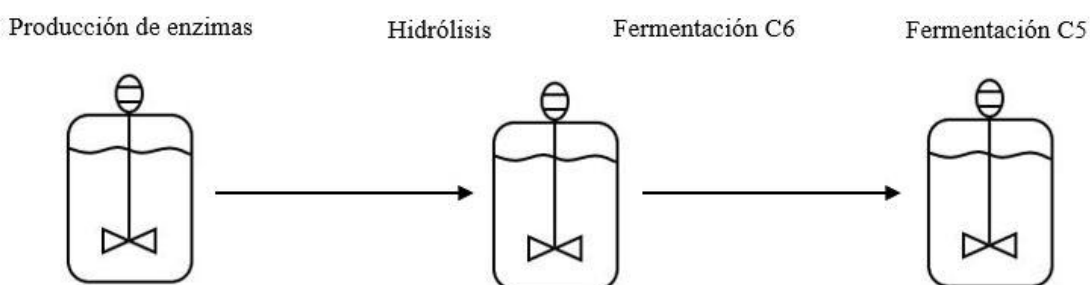


Figura 6.8. Proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas (elaboración propia).

En cuanto a las enzimas necesarias para la hidrólisis, se emplean hasta niveles máximos sin que la concentración de azúcares solubles sea tal como para provocar la inhibición de los microorganismos fermentativos. Las unidades de glucosa y celobiosa no inhiben la actividad de las celulasas gracias a la acción inmediata de la fermentación simultánea (Toor *et al.*, 2020). Profundizando en la importancia de las enzimas, en numerosas investigaciones en que la biomasa es poda de olivo, los complejos celulolíticos se usan junto con β -glucosidasas (Cara *et al.*, 2007; López-Linares *et al.*, 2013; Negro *et al.*, 2014).

Algunas de las ventajas que ofrece este método, además de prevenir la inhibición, son la eliminación de la separación sólido-líquido al utilizar un único recipiente (Manzanares *et al.*, 2011) y que suele obtenerse una mejor producción de bioetanol que en el método anterior (Toor *et al.*, 2020).

Una de las principales limitaciones será que la hidrólisis opera en condiciones de temperatura no óptimas para las enzimas, lo que conlleva mayor tiempo de reacción y problemas de contaminación (Bhalla *et al.*, 2013). Además de la inmovilización, de la que hablaremos más adelante, otra posible solución es emplear bacterias termófilas para la fermentación y sus enzimas termostables, como propone Bhalla *et al.* (2013).

En el estudio de Manzanares *et al.* (2011), en que se utiliza poda de olivo como materia prima para generar bioetanol, el método de hidrólisis y fermentación separadas es comparado con el simultáneo (Tabla 6.7), logrando en el primero un rendimiento en la conversión de azúcares a bioetanol del rango de 43-46%, muy cercano al máximo teórico.

Tabla 6.7. Comparación de concentración de bioetanol entre hidrólisis y fermentación separadas y simultáneas con poda de olivo como biomasa (Manzanares *et al.*, 2011).

Pretratamiento	% Fracción insoluble en agua (w/w)	Bioetanol (g/L) en hidrólisis y fermentación simultáneas	Bioetanol (g/L) en hidrólisis y fermentación separadas
Extracción con agua líquida caliente	9	15,7 (76) ¹	13,4 (65)
	17	19,7 (46)	26,1 (63)
	23	7,1 (11)	29,5 (47)
Ácido diluido	9	12,7 (57)	11,3 (53)
	17	21,9 (49)	22,1 (53)
	23	24,9 (38)	23,8 (38)

¹ Entre paréntesis se muestra el rendimiento de bioetanol respecto al máximo teórico.

- **Hidrólisis y fermentación simultáneas no isotérmicas**

La presente estrategia aparece como solución a uno de los principales problemas planteados en el subapartado anterior, es decir, la puesta en marcha de la hidrólisis a una temperatura que no resulta idónea para las enzimas. Para ello, la fermentación y la hidrólisis se producen simultáneamente, pero en dos reactores diferenciados (Figura 6.9) que se mantienen a diferentes temperaturas. Tras la hidrólisis de la biomasa pretratada en uno de los reactores, el efluente se recircula al fermentador (Wu y Lee, 1998).

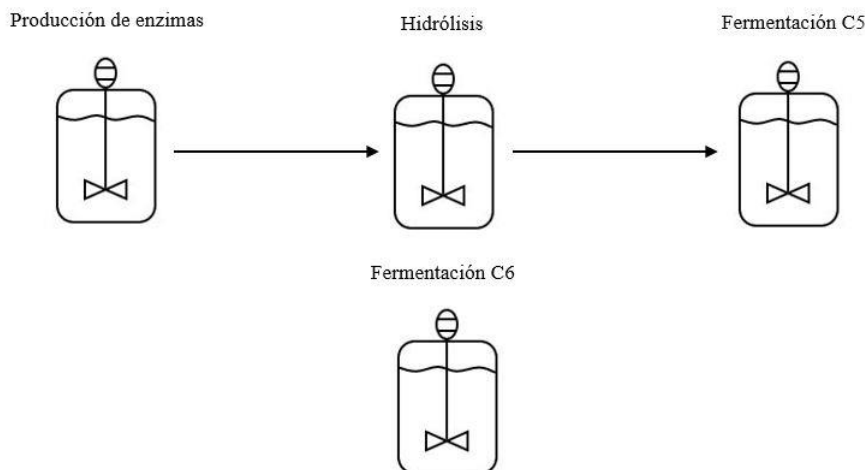


Figura 6.9. Proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas no isotérmicas (elaboración propia).

De esta forma, la actividad de las celulasas se incrementa en dos o tres veces respecto al método isotérmico, además de reducir en un 30-40% la cantidad de enzimas necesitadas (Toor *et al.*, 2020).

- **Hidrólisis y cofermentación simultáneas**

La diferencia más significativa entre la hidrólisis y fermentación simultáneas con este método es que la fermentación de hexosas y pentosas se dan en un mismo reactor al mismo tiempo (Figura 6.10). Esto conlleva, entre otras cosas, que se reduzca el efecto inhibitorio de la xilosa. Además, se trata de mantener una baja concentración de glucosa para que aumente la relación xilosa/glucosa, requisito necesario para la cofermentación (Toor *et al.*, 2020).

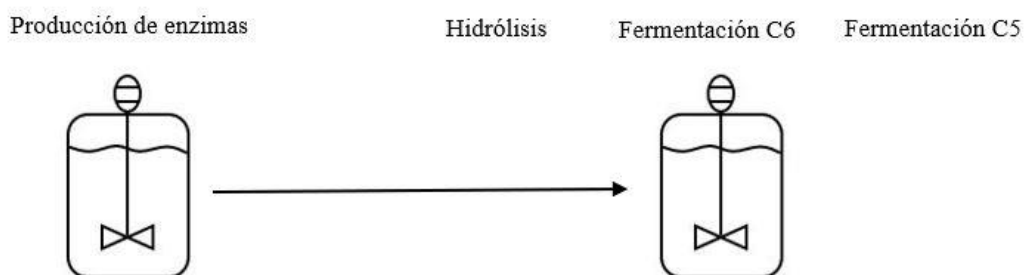


Figura 6.10. Proceso de hidrólisis y cofermentación simultáneas (elaboración propia).

Para poder llevar a cabo la cofermentación, se necesitarán microorganismos modificados genéticamente capaces de aprovechar tanto hexosas como pentosas. En la introducción ya se mencionaron algunos como *Escherichia coli* MM160 o *Zymomonas mobilis* AX101. Sin embargo, teniendo en cuenta la gran cantidad de ventajas que ofrece la *Saccharomyces cerevisiae*, y siendo un organismo tan estudiado, resultaría interesante la utilización de cepas modificadas a partir de ésta. Asimismo, el presente documento centra su estudio en el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* y la fermentación de hexosas.

En el artículo de Fernandes-Klajn *et al.* (2018) se utiliza poda de olivo como materia prima y dos microorganismos fermentativos distintos: la *Escherichia coli* SL100, modificada genéticamente para fermentar hexosas y pentosas durante la cofermentación, y la *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta exclusivamente glucosa y es usada en los procesos donde no se produce cofermentación. Se comparan las estrategias de hidrólisis y fermentación separadas, hidrólisis y cofermentación separadas, hidrólisis y fermentación simultáneas e hidrólisis y cofermentación simultáneas. De entre todas ellas, el mayor rendimiento de bioetanol se obtiene con la hidrólisis y fermentación separadas (0,062 g bioetanol/g materia prima tras 72 horas de hidrólisis), seguida de la hidrólisis y cofermentación separadas (0,050 g bioetanol/g materia prima tras 72 horas de hidrólisis), la hidrólisis y cofermentación simultáneas (0,038 g bioetanol/g materia prima tras 72 horas de hidrólisis) y, por último, la hidrólisis y fermentación simultáneas (0,025 g bioetanol/g materia prima tras 72 horas de hidrólisis). Este resultado confronta con la idea de que los mejores rendimientos son alcanzados a mayor integración se logre en el proceso, aunque podría deberse, entre otros motivos, a que no se toman medidas para proteger a las células de las condiciones desfavorables de la hidrólisis.

- **Hidrólisis, filtración y fermentación simultáneas**

Al igual que en la hidrólisis y fermentación simultáneas no isotérmicas, a pesar de que la hidrólisis y la fermentación se realicen al mismo tiempo, lo harán en reactores diferenciados para poder operar en sus condiciones óptimas (Figura 6.11). Para ello, es necesario un filtro desde el que los compuestos retenidos regresan al recipiente de hidrólisis, mientras que el filtrado rico en azúcares va hacia un reactor para la fermentación antes de ser bombeado de nuevo al recipiente de hidrólisis. En la investigación de Ishola *et al.* (2013), que empleó virutas de abeto como materia prima y fueron pretratadas mediante impregnación con SO₂ y sometidas a 2,2 MPa y 215 °C durante 5 minutos, se alcanzó un rendimiento de producción de bioetanol del 85% sobre el máximo teórico.

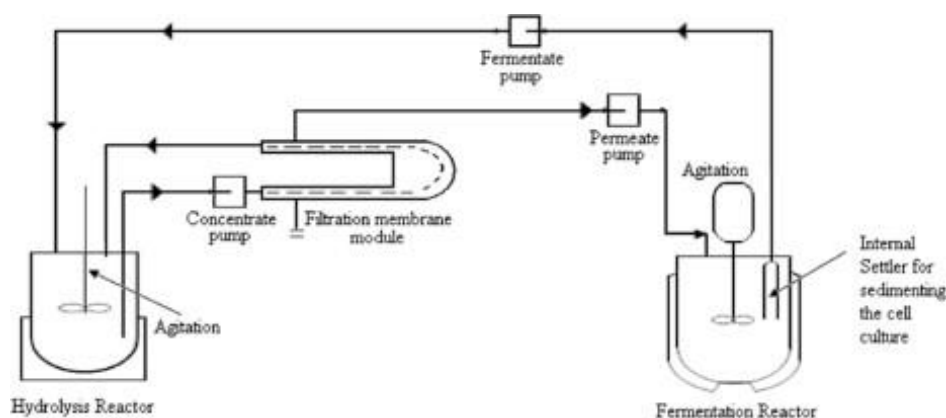


Figura 6.11. Proceso de hidrólisis, filtración y fermentación simultáneas (Ishola *et al.*, 2013).

- **Bioproceso consolidado**

En un bioproceso consolidado se hará todo, desde la producción de enzimas hasta la fermentación de pentosas, en un mismo reactor simultáneamente (Figura 6.12). Como consecuencia, el microorganismo modificado genéticamente para fermentar hexosas y pentosas, deberá además producir las enzimas necesarias para la hidrólisis. De entre los microorganismos que se estudian para emplearlos en el bioproceso consolidado se encuentra el *Clostridium cellulolyticum*, del cual existen investigaciones con cepas recombinantes. Degrada eficientemente la celulosa cristalina y la hemicelulosa de la biomasa lignocelulósica mediante celulosomas (Hasunuma *et al.*, 2013).

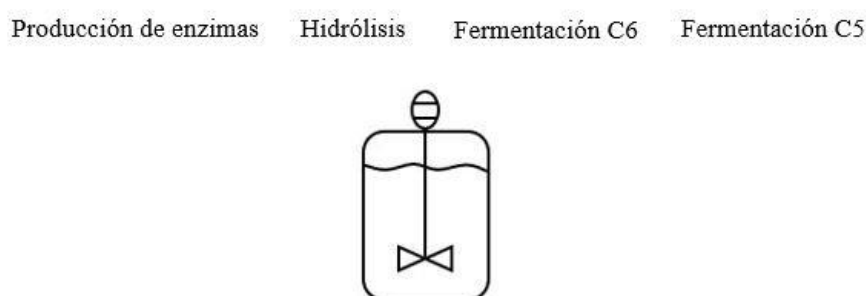


Figura 6.12. Bioproceso consolidado (elaboración propia).

Este método, a pesar de encontrarse en un estado prematuro de desarrollo, es una de las grandes apuestas de futuro para la producción de bioetanol. Aún requiere de más investigación con microorganismos modificados, pero durante los últimos años se han incrementado los estudios (Olson *et al.*, 2012; Hasunuma *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009). Uno de los principales problemas es la heterogeneidad de la biomasa lignocelulósica en su composición, lo que puede provocar que unas enzimas sean válidas para un caso concreto, pero no para otros (Toor *et al.*, 2020).

6.4. Clasificación de métodos de inmovilización

Se propone la inmovilización de los microorganismos responsables de la fermentación con el objetivo de poder llevar a cabo una hidrólisis y fermentación simultáneas. A pesar de que, como se ha visto, existen otras soluciones como el sistema de filtración o el método no isotérmico, en el presente documento se ha decidido profundizar en la opción de inmovilizar a las células fermentativas para protegerlas de las condiciones que favorecen la actividad de las celulasas en la hidrólisis.

Aunque no se han encontrado investigaciones con inmovilización que empleen poda de olivo como materia prima para la producción de bioetanol, sí existen estudios con otras biomásas lignocelulósicas (Singh *et al.*, 2013; Mathew *et al.*, 2013; Adelabu *et al.*, 2017). Sin embargo, sería muy provechoso realizar experiencias de inmovilización con poda de olivo como biomasa para enriquecer el campo de estudio.

Los cultivos inmovilizados presentan una serie de ventajas y desventajas genéricas independientes del tipo de inmovilización usada (Tabla 6.8).

Tabla 6.8. Ventajas y desventajas del cultivo inmovilizado (Romero *et al.*, 2000).

Ventajas	
-	Evita el lavado de biomasa en cultivos en continuo
-	Permite mayor concentración de biocatalizadores en reactor
-	Facilita la separación de poblaciones de la solución
-	Reduce el riesgo de contaminación
Desventajas	
-	La actividad celular puede quedar afectada por las condiciones de inmovilización
-	La velocidad de difusión de sustratos y productos limitan la actividad celular
-	Mayor complejidad y heterogeneidad en el proceso
-	Más caro

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es la aparición de resistencias adicionales al transporte como consecuencia de la inmovilización. La actividad celular se verá afectada por la transferencia de materia, la fisiología celular y la metodología y materiales utilizados en el proceso de inmovilización.

A continuación, se pasa a exponer las principales técnicas de inmovilización.

Retención química

- **Unión a soportes**

El soporte debe presentar resistencia mecánica frente a las condiciones de operación y facilitar su separación del medio líquido. Puede ser orgánico o inorgánico.

La unión al soporte puede darse mediante adsorción iónica (método químico), enlace iónico (unión mucho más fuerte que la adsorción), enlace metálico (requiere del empleo de compuestos químicos con metales de transición) y enlace covalente (Romero *et al.*, 2000). Dado que el enlace covalente se utiliza sobre todo para inmovilizar enzimas, ya que afecta a la viabilidad celular, el documento se centrará en la adsorción.

A pesar de estar en el subapartado de retención química, profundizando en la adsorción, se encuentra en la literatura que también puede implicar uniones físicas como las iónicas, de Van der Waals o puentes de hidrógeno. Es uno de los métodos más sencillos y poco lesivos para la célula. Sin embargo, las interacciones son débiles (Bickerstaff, 1997). No se han encontrado estudios que empleen la adsorción en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, pero sí a partir de soluciones azucaradas. En el artículo Moo-Young *et al.* (1980) se utilizan como soporte adsorbente virutas de madera de haya y cerámica de manera satisfactoria.

- **Entrecruzamiento**

El entrecruzamiento (Figura 6.13), o reticulado, consiste en la agregación de varias células entre sí. Podría llevarse a cabo de forma pura (autoinmovilización), aprovechando la capacidad de algunos microorganismos para formar agregados, o por coreticulado, utilizando agentes externos que causan la agregación.

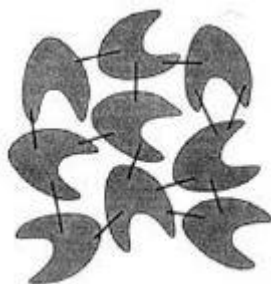


Figura 6.13. Entrecruzamiento (Bickerstaff, 1997).

Comúnmente, se emplean reactivos bi o multifuncionales, conocidos como brazos espaciadores que poseen en sus extremos grupos funcionales que reaccionan con los respectivos grupos funcionales de las células (Romero *et al.*, 2000). Algunos de estos reactivos son el glutaraldehído y el diisocianato de tolueno, siendo su toxicidad un factor limitante en la aplicación del método (Bickerstaff, 1997).

Los enlaces suelen ser irreversibles y resisten condiciones extremas de pH y temperatura. Como aspecto negativo, se dificulta el acceso del sustrato.

En el estudio de Adelabu *et al.* (2017), que utiliza paja de maíz como materia prima, se experimenta con la inmovilización de levaduras en una matriz de *Mucuna urens* (leguminosa tropical de la familia fabácea). Para ello, se mezcló la suspensión de levaduras con la *Mucuna urens* entrecruzada mediante adición de glutaraldehído (2,5%). Se logró una mayor producción de bioetanol en las levaduras inmovilizadas que en las libres debido, principalmente, a la protección de las células frente a toxinas durante la fermentación. Se emplea *Mucuna urens* por sus propiedades de estabilidad, gelificación y capacidad de almacenamiento.

Retención física

- **Atrapamiento**

Las células quedan retenidas en una estructura molecular cerrada (Figura 6.14) que puede ser una red de un polímero o membranas semipermeables con poros suficientemente pequeños para evitar la lixiviación, pero permitan la difusión de sustrato y producto (Romero *et al.*, 2000).

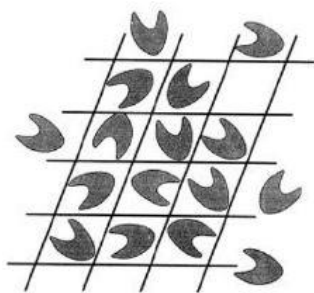


Figura 6.14. Atrapamiento (Bickerstaff, 1997).

Los biocatalizadores no sufren modificaciones, pero existen agentes capaces de atacar los polímeros.

Entre algunos ejemplos de atrapamiento celular en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, se encuentra el artículo de Singh *et al.* (2013), que utiliza bagazo de caña de azúcar como materia prima. El método se llevó a cabo con agar-agar, al que se le adicionó la suspensión celular de manera previa a la división en cubos (4 mm^3). Al comparar en el mismo estudio el rendimiento de la producción de bioetanol con inmovilización agar-agar y con alginato cálcico, se obtuvo menor rendimiento con el agar-agar (0,33 g producto/g sustrato frente a 0,38 de la otra inmovilización).

- **Microencapsulación**

En ciertas clasificaciones la microencapsulación (Figura 6.15) queda enmarcada dentro del atrapamiento, pero dada su relevancia se ha decidido establecer un subapartado específico para este método.

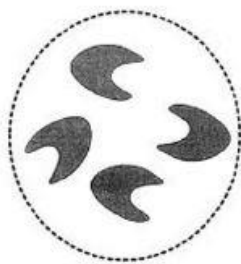


Figura 6.15. Microencapsulación (Bickerstaff, 1997).

Aunque la técnica pueda realizarse con diversos materiales, como partiendo de diisocianato de tolueno y tetrametilenpentamina para dar una membrana de poliurea (Romero *et al.*, 2000), el presente trabajo se centrará en las perlas de alginato cálcico por su extendido uso.

Las membranas serán semipermeables para permitir el paso de sustrato y producto. Ya se habló de las ventajas y desventajas de las perlas de alginato cálcico en la Tabla 4.3 de la introducción, por lo que a continuación se pasa a comentar una de las mayores preocupaciones del encapsulamiento: la

difusión. Existe difusión en tres capas: la capa límite, la membrana permeable y el interior de la cápsula. Si la mayor resistencia se encontrara en la capa límite, podría disminuirse aumentando la velocidad de agitación. Si la mayor resistencia estuviera en la membrana, habría que hacerla menos espesa.

Como ya se comentó al principio del apartado, no se han encontrado estudios de producción de bioetanol con inmovilización mediante perlas de alginato cálcico que empleen poda de olivo como materia prima. Para investigaciones posteriores, sería recomendable llevar a cabo la experiencia y recabar datos. Sin embargo, sí existen artículos que utilicen otras materias primas lignocelulósicas, como el de Singh *et al.* (2013), mencionado anteriormente, que usa bagazo de caña de azúcar. En él, se mezcla una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* con una solución de alginato de sodio. Tras dejar la mezcla caer en una solución estéril de cloruro de calcio se forman las perlas de alginato de calcio con las levaduras en su interior (3 mm diámetro aproximadamente). El resultado fue un rendimiento de producción de bioetanol de 0,38 g producto/g sustrato.

En otros estudios, como el de Mathew *et al.* (2013), que emplea paja de colza como materia prima, utiliza un método similar al descrito en el párrafo anterior para obtener las perlas de alginato, teniendo éstas también 3 mm de diámetro. La producción máxima de bioetanol alcanzada fue de 169,26 gramos de bioetanol por kilogramo de materia prima, siendo el rendimiento de bioetanol aproximadamente un 25% superior al de las células libres.

También existen investigaciones de microencapsulación que no usan el alginato cálcico para la elaboración de las perlas, como Watanabe *et al.* (2012), cuyas cápsulas son de resina fotoenlazable. La biomasa del estudio es paja de arroz y se inmovilizan levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso, el rendimiento de bioetanol de las células inmovilizadas fue inferior al de las células libres (76,9% del máximo teórico frente a 85,2%). Una de las razones podría ser que el material de las perlas presentara mayores problemas de difusión que las de alginato cálcico.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

La poda de olivo es una biomasa lignocelulósica con gran potencial, renovable y de bajo coste para la producción de bioetanol de segunda generación en la Comunidad Autónoma de Andalucía, donde se cuenta con una elevada disponibilidad de la materia prima sin que se le apliquen otros usos tan provechosos y medioambientalmente responsables. Al ser, además, de origen lignocelulósico, no competiría con el mercado de la alimentación.

A continuación, a partir de los objetivos que se plantearon al comienzo del trabajo, quedan recogidas las siguientes conclusiones extraídas como resultado del presente estudio (el cuarto objetivo, relacionado con la realización de propuestas innovadoras, queda patente a lo largo de la Solución Técnica):

Recopilar varios métodos de pretratamiento de la poda de olivo para la obtención de bioetanol

- Resulta conveniente llevar a cabo más de un pretratamiento para optimizar el rendimiento de hidrólisis.
- Pretratamiento secuencial: La molienda ofrece buenos resultados como primer método, ya que reduce la cristalinidad, el grado de polimerización de la biomasa y aumenta el área superficial. La extracción con agua líquida caliente, que reduce la cantidad de extractivos tanto como sea posible, resulta una buena elección como segundo método. Como último pretratamiento, la explosión de vapor es recomendable dada su efectividad y que está ampliamente estudiada con poda de olivo, evitando el uso de tóxicos.
- El pretratamiento con organosolventes es uno de los más efectivos, pero es demasiado caro con vistas a escalar el proceso a nivel industrial.
- Los ácidos diluidos, a pesar de sus ventajas, no sería tan respetuoso con el medio ambiente debido a su toxicidad.

Analizar las diferentes estrategias de fermentación en los procesos de producción de bioetanol

- La mayoría de investigaciones se centran en la hidrólisis y fermentación en batch separadas.
- Para el correcto desempeño de la hidrólisis y fermentación simultáneas se requiere de la inmovilización de las células fermentativas, u otros métodos como la hidrólisis, filtración y fermentación simultáneas o la hidrólisis y fermentación simultáneas no isotérmicas.

Exponer las posibles técnicas de inmovilización de microorganismos a emplear en la etapa fermentativa

- No se han encontrado investigaciones de inmovilización con poda de olivo como materia prima.
- En otras biomásas lignocelulósicas destaca la inmovilización por microencapsulación, especialmente mediante perlas de alginato cálcico.

Las perspectivas de futuro de la producción de bioetanol a partir de residuos autóctonos de cada región son alentadoras en un contexto cada vez más concienciado de la necesidad de combustibles menos dañinos para el medio ambiente. Para que dichas expectativas continúen en progresión ascendente:

- Se requiere de mayor cantidad de estudios en relación a aspectos como la inmovilización con poda de olivo como materia prima.
- Sería conveniente ampliar las investigaciones de varios pretratamientos sobre la poda de olivo.
- La integración del proceso de producción de bioetanol y su escalado hasta llegar a nivel industrial sería imprescindible para lograr implantar biorrefinerías donde no sólo se generara bioetanol, sino una amplia gama de bioproductos a partir de todos los residuos del olivar.

Con el objetivo de avanzar en la investigación con poda de olivo en un futuro próximo, se recomendaría abordar una experiencia en que se siguiera un pretratamiento secuencial como el descrito en las conclusiones (molienda, extracción con agua líquida caliente y explosión de vapor), la hidrólisis y la fermentación fueran simultáneas y las células fermentadoras estuvieran inmovilizadas para protegerlas de las condiciones desfavorables de la hidrólisis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adelabu, B. A., Kareem, S. O., Oluwafemi, F., y Adeogun, I. A. (2017). Bioconversion of corn Straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. *Journal of King Saud University – Science*, 31(1), 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., y Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631-653. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Agencia Andaluza de la Energía. (2011). Estudio básico sobre el sector de los biocarburantes. Recuperado de <https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/>
- Agencia Andaluza de la Energía. (2017). La Biomasa en Andalucía. Recuperado de <https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/>
- Agencia Andaluza de la Energía. (2018). Situación Energética de Andalucía. Recuperado de <https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/>
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T. I., y Dale, B. E. (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124(1-3), 1133-1142. <https://doi.org/10.1385/abab:124:1-3:1133>
- Alzola, F. (1945). System of continuous fermentation. EEUU.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., y Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry And Biophysics Reports*, 10, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Sáez, F., Castro, E., Manzanares, P., Negro, M. J., y Oliva, J. M. (2011). Effect of water extraction on sugar recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresource Technology*, 102(11), 6611-6616. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.077>
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., y Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversión to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. En G. F. Bickerstaff (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 1-11). Totowa, EEUU: Humana Press.
- Cabrera, G., Gómez, J. M., y Cantero, D. (2008). Integrated system for the biological solubilization and precipitation of heavy metals for the remediation of contaminated media. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(4), 553-558. <https://doi.org/10.1002/jctb.1832>

- Cara, C., Romero, I., Oliva, J. M., Sáez, F., y Castro, E. (2007). Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 137-140(1-12), 379-394. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9066-y>
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., y Castro, E. (2008a). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), 692-700. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.05.008>
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J. M., Sáez, F., y Castro, E. (2008b). Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 99(6), 1869-1876. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.037>
- Ceccolini, S., y Bruni, B. (1979). *Note pratiche di olivicoltura*. Michigan, EEUU: Edagricole.
- Díaz, M. J. (2011). *Producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas* (tesis doctoral). Universidad de Jaén, Jaén, España.
- Díaz, M. J., Cara, C., Ruiz, E., Romero, I., Moya, M., y Castro, E. (2010). Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. *Bioresource Technology*, 101(7), 2428-2435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.085>
- Díaz, M. J., Huijgen, W. J. J., van der Laan, R. R., Reith, J. H., Cara, C., y Castro, E. (2011). Organosolv pretreatment of olive tree biomass for fermentable sugars. *Holzforschung*, 65(2), 177-183. <https://doi.org/10.1515/hf.2011.030>
- Elgharbawy, A. A., Alam, M. Z., Moniruzzaman, M., y Goto, M. (2016). Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 252-267. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.021>
- Escobar, J. C., Rúa, D. J., Silva, E., Venturini, O. J., y Mambeli, R. (2015). Procesos biológicos de conversión. En J. M. Rincón, y E. E. Silva (Ed.), *Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad* (pp. 123-164). Bogotá, Colombia: Red Iberoamericana de Aprovechamiento de Residuos Orgánicos en Producción de Energía.
- Fan, L. T., Lee, Y. H., y Gharpuray, M. M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Microbial Reactions. Advances in Biochemical Engineering*, 23, 157-187. https://doi.org/10.1007/3540116982_4
- Fengel, D., y Weneger, G. (1989). *Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions*. Berlín-Nueva York, Alemania-EEUU: Walter de Gruyter.

- Fernandes-Klajn, F., Romero-García, J. M., Díaz, M. J., y Castro, E. (2018). Comparison of fermentation strategies for ethanol production from olive tree pruning biomass. *Industrial Crops & Products*, 122, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.063>
- Garzón-Jiménez, C., y Barragán-Huerta, B. E. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 23-34.
- Gu, T., Held, M. A., y Faik, A. (2013). Supercritical CO₂ and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. *Environmental Technology*, 34(13-14), 1735-1749. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.809777>
- Guilherme, A., Dantas, P., Santos, E., Fernandes, F., y Macedo, G. (2015). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, 32(1), 23-33. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146>
- Harmsen, P., Huijgen, W. J. J., Bermudez, L., y Bakker, R. (2010). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. Wageningen, Países Bajos: ECN Biomass, Coal and Environmental Research.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., y Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, 135, 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>
- Hatakeyama, H., y Hatakeyama, T. (2009). Lignin Structure, Properties, and Applications. *Advances in Polymer Science*, 1-63. doi:10.1007/12_2009_12
- Hendriks, A., y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía. (2009). Explotación Censo Agrario 2009 del INE. Recuperado de <https://www.juntadeandalucia.es/>
- Ishola, M. M., Jahandideh, A., Haidarian, B., Brandberg, T., y Taherzadeh, M. J. (2013). Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): A novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 133, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.130>
- Kabir, G., y Hameed, B. H. (2017). Recent progres son catalytic pyrolysis of lignocellulosic biomass to high-grade bio-oil and bio-chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70, 945-967. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.001>

- Kamm, B., Gruber, P. R., y Kamm, M. (2006). *Biorefineries-industrial processes and products*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH.
- Kim, T. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. En S. Yang, H. El-Ensanshy, y N. Thongchul (Ed.), *Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers* (pp. 91-105). Hoboken, EEUU: Wiley-AIChE.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., y Strove, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P., y Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 23(10), 1497-1501. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9383-x>
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., y Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, 81(1), 33-44. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00103-1](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00103-1)
- López-Linares, J. C., Romero, I., Moya, M., Cara, C., Ruiz, E., y Castro, E. (2013). Pretreatment of olive tree biomass with FeCl_3 prior enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 128, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.076>
- Manzanares, P., Negro, M. J., Oliva, J. M., Saéz, F., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Castro, E., y Ruiz, E. (2011). Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(6), 881-887. <https://doi.org/10.1002/jctb.2604>
- Martínez-Patiño, J. C., Romero, I., Ruiz, E., Cara, C., Romero-García, J. M., y Castro, E. (2017b). Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 12(1). <https://doi.org/10.15376/biores.12.1.1779-1797>
- Martínez-Patiño, J. C., Romero-García, J. M., Ruiz, E., Oliva, J. M., Álvarez, C., Romero, I., Negro, M. J., y Castro, E. (2015). High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy & Fuels*, 29(3), 1735-1742. <https://doi.org/10.1021/ef502541r>
- Martínez-Patiño, J. C., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., López-Linares, J., y Castro, E. (2017a). Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol

- production. *Bioresource Technology*, 239, 326-335.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.102>
- Mathew, A. K., Crook, M., Chaney, K., y Humphries, A. C. (2013). Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rape Straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biomass And Bioenergy*, 52, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.028>
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. En M. E. Himmel, J. O. Baker, y R. P. Overend (Ed.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (pp. 292-324). Washington, EEUU: American Chemical Society.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2012). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivo: Análisis de las plantaciones de olivar en España. Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019a). Distribución de la superficie y producción de cereales en España por Comunidades Autónomas. Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019b). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos. Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020). Leguminosas grano en España (judías secas, lentejas, garbanzos, vezas grano y veros). Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/>
- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y. C., y Zhang, M. (2002). Cofermentation of glucosa, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 885-898. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0119-9_72
- Molina de la Rosa, J. L., Jiménez, B., Ruiz, F., García, F., López, F., y Salmerón, E. (2010). *Agronomía y poda del olivar*. Sevilla, España: Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- Moo-Young, M., Lamptey, J., y Robinson, C. W. (1980). Immobilization of yeast cells on various supports for ethanol production. *Biotechnology Letters*, 2(12), 541-548.
<https://doi.org/10.1007/bf00134904>
- Morales, S. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., y Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578-597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Negro, M., Alvarez, C., Ballesteros, I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M., y Oliva, J. M. (2014). Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresource Technology*, 153, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.079>
- Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. J., y Lynd, L. R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00121-3)
- Ramos, I. (2017). Caracterización química de tres residuos lignocelulósicos generados en la región del Cantón Alausí. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG-UNMSM*, 20(40), 80-85.
- Ramos, F. D., Díaz, M. S., y Villar, M. A. (2016). Biocombustibles. *Ciencia Hoy*, 25(147), 69-73.
- Romero, M. D., Romero, L. E., y Cantero, D. (2000). *Desactivación del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa*. Cádiz, España: Servicio de Publicaciones Universidad de Cádiz.
- Sainz, M. A. (2016). *Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Secretaría General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2019). Análisis de la densidad en las plantaciones de olivar en Andalucía. Recuperado de <https://www.juntadeandalucia.es/>
- Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., y Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98(16), 3000-3011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022>
- Sindhu, R., Binod, P., y Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Singh, A., Sharma, P., Saran, A. K., Singh, N., y Bishnoi, N. R. (2013). Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*, 50, 488-493. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.07.003>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., y Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>

- Slade, R., Saunders, R., Gross, R., y Bauen, A. (2011). *Energy from biomass*. Londres, Reino Unido: UK Energy Research Centre.
- Summerell, B. A., y Burgess, L. W. (1989). Decomposition and chemical composition of cereal straw. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(4), 551-559. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90129-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90129-6)
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00212-7)
- Taherzadeh, M. J., y Karimi, K. (2008). Bioethanol: Market and Production Processes. En A. Nag (Ed.), *Biofuels Refining and Performance* (69-106). Nueva York, EEUU: McGraw-Hill Companies.
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., y Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125080>
- Travaini, R., Otero, M. D. M., Coca, M., Da-Silva, R., y Bolado, S. (2013). Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology*, 133, 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>
- Watanabe, I., Miyata, N., Ando, A., Shiroma, R., Tokuyasu, K., y Nakamura, T. (2012). Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice Straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresource Technology*, 123, 695-698. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.052>
- Wu, L., Arakane, M., Ike, M., Wada, M., Takai, T., Gau, M., y Tokuyasu, K. (2011). Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*, 102(7), 4793-4799. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.023>
- Wu, Z., y Lee, Y. Y. (1998). Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. En M. Finkelstein, y B. H. Davison (Ed.), *Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology* (pp. 479-492). Totowa, EEUU: Humana Press.
- Xu, Q., Singh, A., y Himmel, M. E. (2009). Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 364-371. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.006>